

# **Intracellulær og fullblodsfarmakokinetikk til ciklosporin A hos hjertetransplanterte pasienter**

**Nina Kaajal Næss**



Masteroppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdelingen for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2010

# **Intracellulær og fullblodsfarmakokinetikk til ciklosporin A hos hjertetransplanterte pasienter**

**Nina Kaajal Næss**



Masteroppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdelingen for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2010

Veileder

Professor Anders Åsberg

---

## Forord

Denne masteroppgaven er utført under veiledning av Professor Anders Åsberg ved Avdelingen for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble påbegynt i august 2009 og avsluttet i mai 2010.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Anders Åsberg for svært god oppfølging og veiledning gjennom hele perioden. Den alltid positive innstillingen og det endeløse engasjementet har vært inspirerende.

En takk går til Pål Falck for å ha hjulpet meg med oppstarten av oppgaven og kommet med viktige innspill underveis. Han har gjennom sitt arbeid introdusert meg til den fantastiske verdenen til ciklosporin A.

Jeg vil rette en stor takk til stipendiat Rune Amundsen for opplæring i metoder og gode råd underveis i det praktiske arbeidet. En ekstra takk for å ha reddet meg, tidlige morgener og sene kvelder, når ionefella har spilt meg noen puss.

Jeg vil også takke avdelingsingeniør Siri Johannesen for stor hjelp i forbindelse med det praktiske arbeidet, og for å ha svart på utallige spørsmål. I tillegg vil jeg takke resten av avdelingen for farmasøytisk biovitenskap for et koselig og inspirerende arbeidsmiljø.

En spesiell takk går til den fantastiske gjengen på hovedfagskontoret for å gjøre dette året uforglemmelig på så mange måter.

Til slutt vil jeg takke familien min for å ha oppmuntret meg gjennom alle år, og en spesiell takk til Marie for uvurderlig støtte, omtanke og for alltid å stille opp for meg.

Oslo, 14. mai 2010

Nina K. Næss

---

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD .....</b>	<b>3</b>
<b>INNHALDSFORTEGNELSE .....</b>	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
1.1 HJERTETRANSPLANTASJON .....	10
1.1.1 Utvelgelseskriterier og kontraindikasjoner for hjertetransplantasjon .....	10
1.1.2 Immunsupprimerende behandling .....	11
1.1.3 Overlevelse .....	11
1.1.4 Komplikasjoner .....	12
1.2 CIKLOSPORIN A.....	12
1.2.1 Virkningsmekanisme.....	14
1.2.2 Bivirkninger og toksisitet .....	15
1.2.3 Farmakokinetikk.....	16
1.2.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering.....	20
1.3 BAKGRUNN FOR STUDIEN .....	21
1.4 MÅL MED OPPGAVEN.....	22
<b>2. MATERIALE OG METODER.....</b>	<b>23</b>
2.1 PASIENTER OG PRØVEMATERIALE .....	23
2.2 ANALYSEMETODER .....	23
2.2.1 Isolering av T-lymfocytter .....	23
2.2.2 Fast-fase-ekstraksjon .....	25
2.2.3 LC-MS/MS-analyse .....	30

---

2.2.4	Genotyping og måling av genuttrykk .....	31
<b>3.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>32</b>
3.1	DEMOGRAFISK OG KLINISK PASIENTDATA.....	32
3.2	MASSEKROMATOGRAM AV ANALYTTENE .....	33
3.3	FULLBLODS- OG INTRACELLULÆRKONSENTRASJONER.....	35
3.4	GENOTYPING AV P-GP OG CYP3A5 .....	38
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>41</b>
4.1	FULLBLODS- OG INTRACELLULÆRKONSENTRASJONER I T-LYMFOCYTTER .....	41
4.2	METABOLITTER.....	44
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>FREMTIDSUTSIKTER .....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERANSELISTE .....</b>	<b>48</b>
	<b>APPENDIKS .....</b>	<b>53</b>
	REAGENSER.....	53
	UTSTYR .....	54
	LØSNINGER.....	56
	LC-MS/MS- INNSTILLINGER .....	57
	<i>Innstillinger for MS- Finnigan LCQ<sup>TM</sup> DUO.....</i>	<i>57</i>
	<i>MS/MS- konfigurering for analyttene .....</i>	<i>58</i>
	STANDARDKURVER FOR CsA OG METABOLITTENE I FULLBLOD .....	59
	INTRACELLULÆR- OG FULLBLODSKONSENTRASJONER .....	71
	STUDIEPROTOKOLL .....	79
	TILRÅDNING FRA REGIONAL KOMITÉ FOR MEDISINSK FORSKNINGSETIKK .....	91
	PASIENTINFORMASJON .....	92

---

## Forkortelser

<i>ABCB1</i>	- gensekvens som koder for P-gp
ACN	- acetonitril
AM1	- Ciklosporin A-metabolitt hydroksylert i aminosyre 1
AM19	- Ciklosporin A-metabolitt hydroksylert i aminosyre 1 og 9
AM1c	- Ciklosporin A-metabolitt hydroksylert og syklisert i aminosyre 1
AM1c9	- Ciklosporin A-metabolitt hydroksylert og syklisert i aminosyre 1 og hydroksylert i aminosyre 9
AM4N	- Ciklosporin A-metabolitt demetylert i aminosyre 4
AM9	- Ciklosporin A-metabolitt hydroksylert i aminosyre 9
AUC	- arealet under konsentrasjonstidskurven
B-lymfocyt	- antistoffproduserende lymfocyt
$C_0$	- konsentrasjon i forkant av en gitt dose
$C_2$	- konsentrasjon to timer etter gitt dose
CsA	- Ciklosporin A
CsC	- Ciklosporin C
CV	- variasjonskoeffisient
CYP	- cytokrom P450
g	- måleenhet for relativ sentrifugalkraft
HPLC	- høytrykksvæsketromatografi

---

IL-2	- interleukin 2
IS	- intern standard
LC-MS/MS	- væskechromatografi med tandem-massespektrometri
m/z	- masse/ladnings-ratio
MeOH	- metanol
MHC	- hovedhistokompatibilitetskompleks
MRM	- multiplere reaksjonsmonitorering
mTOR-hemmer	- mammalian mål for rapamycin
NFAT	- nukleærfaktor for aktiverte T-lymfocytter
PBS	- Fosfatbufret saltvann
P-gp	- P-glykoprotein
QC	- kvalitetskontroll
R <sup>2</sup>	- regresjonskoeffisient
TCR	- T-lymfocytreseptor
TDM	- terapeutisk legemiddelmonitorering
T-lymfocyt	- thymusmodnet lymfocyt

---

## Sammendrag

**Bakgrunn:** Ciklosporin A (CsA) er et immunosuppressivt legemiddel, som virker immundempende ved å hemme kalsineurin intracellulært i T-lymfocytter. CsA er assosiert med flere alvorlige bivirkninger, og har en farmakokinetikk med stor inter- og intraindividuell variabilitet. Dette, i tillegg til et smalt terapeutisk vindu, gjør terapeutisk legemiddelmonitorering nødvendig. Rutinemålinger av CsA blir i dag utført i fullblod, men intracellulære målinger i T-lymfocytter har blitt foreslått å kunne gi mer betydningsfull informasjon om den immunosuppressive effekten av CsA.

**Mål:** Formålet med oppgaven var å undersøke sammenhenger mellom fullblods- og intracellulærkonsentrasjoner av CsA og rejeksjoner i hjertetransplanterte pasienter.

**Metode:** Det ble fulgt opp 10 hjertetransplanterte pasienter ved Rikshospitalet i tidlig posttransplantert periode. Samtlige pasienter ble behandlet med CsA, mykofenolatmofetil og steroider, og avga blodprøver for måling av CsA og metabolitter ved hvert rutinebesøk. Pasientene ble genotypet for P-glykoprotein og cytokrom P450 3A5 (CYP3A5). T-lymfocytter ble isolert ved hjelp av PrepaCyte<sup>®</sup>-TC cellesepareringsmedium. Det ble brukt proteinfelling og fast-fase-ekstraksjon for opparbeidelse av prøver. Konsentrasjonsbestemmelsen av CsA og metabolittene, både i fullblod og intracellulært i T-lymfocytene, ble gjort ved anvendelse av en tidligere validert metode med væsekromatografi koblet med tandem-massespektrometri.

**Resultat:** Pasientene, 2 kvinner og 8 menn, hadde en gjennomsnittsalder på  $52 \pm 12$  år, og en gjennomsnittsvekt på  $76,7 \pm 18,0$  kg. I løpet av studien fikk 3 pasienter akutt rejeksjon. En av rejeksjonspasientene hadde en lavere intracellulær konsentrasjon enn gjennomsnittet av ikke-rejeksjonspasientene, mens to av rejeksjonspasientene hadde en høyere intracellulær konsentrasjon. Det ble ikke funnet noen nedgang i intracellulærkonsentrasjonen i tiden rett forut for rejeksjonsepisodene. Pasientene



---

som uttrykte funksjonelt CYP3A5 (\*1/\*3) ble funnet å ha høyere nivåer av AM19, AM1c9, AM1c, AM4N metabolittene, men like mye AM9 og mindre AM1 og CsA enn pasienter med *CYP3A5*\*3/\*3 genotypen. En pasient hadde nyresvikt i løpet av studien og denne pasienten hadde også den høyeste konsentrasjonen av den potensielt nefrotoksiske metabolitten AM19.

**Konklusjon:** Det ble ikke funnet noen biomarkør for å kunne forutse rejeksjon hos hjertetransplanterte, men en sammenheng mellom generell lav intracellulær konsentrasjon av CsA i T-lymfocytter og rejeksjon kunne ikke utelukkes. Pasienter som uttrykte funksjonelt CYP3A5 ble funnet å ha høyere nivåer av metabolittene AM19, AM1c9, AM1c og AM4N.

---

# 1. Innledning

## 1.1 Hjertetransplantasjon

Den første hjertetransplantasjonen som ble utført på menneske ble gjennomført i 1967 i Cape Town (Barnard 1967), mens den første hjertetransplantasjonen i Norge ble gjennomført på Rikshospitalet i 1983 (Frøysaker *et al.* 1984). I Norge har Rikshospitalet en landsfunksjon for all organtransplantasjon og er det største hjertetransplantasjonssenteret i Norden. På Rikshospitalet er det de siste årene blitt operert 25-30 pasienter per år, med et maksimum på 45 pasienter i 2003 (Simonsen *et al.* 2007).

### 1.1.1 Utvelgelseskriterier og kontraindikasjoner for hjertetransplantasjon

Donormangel gjør at det må stilles krav til hvilke pasienter, som skal bli satt på venteliste for hjertetransplantasjon. For å få hjertetransplantasjon må pasientene oppfylle strenge kriterier (Simonsen og Geiran 2004). Pasientene skal ha terminal hjertesvikt med en forventet levetid på under 6-12 måneder. De skal ha hjertesvikt i funksjonsklasse IV (III-IV) under beste behandlingsregime. I hvert enkelt tilfelle skal alle andre hjertekirurgiske behandlingsmuligheter være forsøkt, vurdert eller være uaktuelle. Det viktigste er at pasientene er svært motivert og kompetent til å følge et eksakt og omfattende regime.

Etter hovedprinsippet er det enkelte pasienter som ikke skal vurderes for hjertetransplantasjon (Simonsen og Geiran 2004). Dette gjelder de pasientene som har en annen sykdom som vil bli forverret av transplantasjonen og supprimeringen av immunsystemet, eller en annen sykdom som har et dårligere sykdomsforløp enn transplantasjonen.

---

### 1.1.2 Immunsupprimerende behandling

Ved organtransplantasjoner må immunforsvaret til resipienten dempes for å hindre rejeksjonsepisoder. Det første immunsupprimerende behandlingsregimet ved hjertetransplantasjoner var prednisolon og azatioprin, men dette viste ikke tilfredsstillende resultater (Simonsen og Geiran 2004). Etter at Ciklosporin A (CsA) ble oppdaget i begynnelsen av 1980-årene, ble det en del av standardbehandlingen sammen med prednisolon og azatioprin. Det er i senere tid kommet nye immunsupprimerende medikamenter, som tacrolimus, mTOR-hemmere (sirolimus og evrolimus) og mykofenolat. Nå brukes vanligvis en kalsineurinhemmer (ciklosporin eller tacrolimus) eller mTOR-hemmer, i kombinasjon med glukokortikoid og et cytostatikum (azatioprin eller mykofenolat) og/eller antistoff (basiliximab/daclizumab) (Frøland 2007).

### 1.1.3 Overlevelse

Pasientoverlevelsen for hjertetransplanterte har økt på grunn av bedre oppfølging, intensivbehandling og immunsupprimerende regime (Simonsen *et al.* 2007). Ved Rikshospitalet er det vist at ett år etter hjertetransplantasjon lever ca. 85 % av pasientene, mens 12 år etter transplantasjonen lever ca. 50 % av pasientene. Ettersom dette er en pasientgruppe som har en forventet levetid på under 6-12 måneder, kan dette sies å være en betydelig fremgang. Overlevelsen blir påvirket av faktorer som mottakers og donors alder. Uansett donors alder vil en ung pasient (<50 år) ha den beste prognosen, mens den gruppen som har dårligst overlevelse er de eldre pasientene (>50 år) med eldre donor (>35 år).

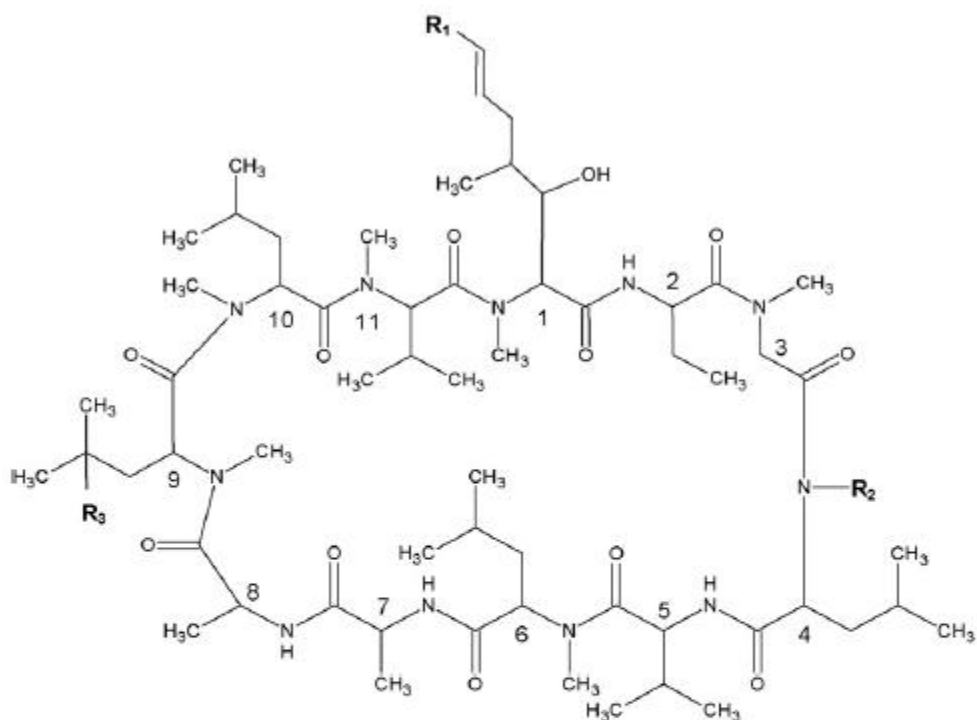
---

#### 1.1.4 Komplikasjoner

Hjertetransplanterte er utsatt for komplikasjoner i forhold til den grunnleggende sykdommen, til selve transplantasjonen, immunsupprimeringen eller den andre medikamentelle behandlingen (Simonsen og Geiran 2004). I den første fasen etter hjertetransplantasjonen er reaksjoner, organsvikt og cytomegalovirusinfeksjoner det største problemet og dette kan være vanskelig å diagnostisere og behandle. En komplikasjon som kan forekomme i langtidsforløpet er nyresvikt, dette skyldes sannsynligvis behandlingen med CsA som er nefrotoksisk. CsA kan også medføre flere komplikasjoner, som omtales i 1.2.2 *Bivirkninger og toksisitet*.

### 1.2 Ciklosporin A

CsA er et immunosuppressivt legemiddel, til bruk ved blant annet transplantasjoner for å unngå reaksjon. CsA ble første gang isolert av Borel og Stähelin, som undersøkte sopparten *Tylopocladium inflatum gams* funnet i jordprøver tatt fra Hardangervidda, Norge (Borel *et al.* 1976). Borel og Stähelin fant i 1971 ut at CsA har en immunosuppressiv effekt. I 1983 ble CsA lansert som et immunosuppressivt legemiddel, noe som økte behandlingseffekten til transplanterte betraktelig (CMTS 1983; Hariharan *et al.* 2000). CsA er et sirkulært peptid bestående av 11 aminosyrer, med struktur og hovedmetabolitter som vist i Figur 1.1.



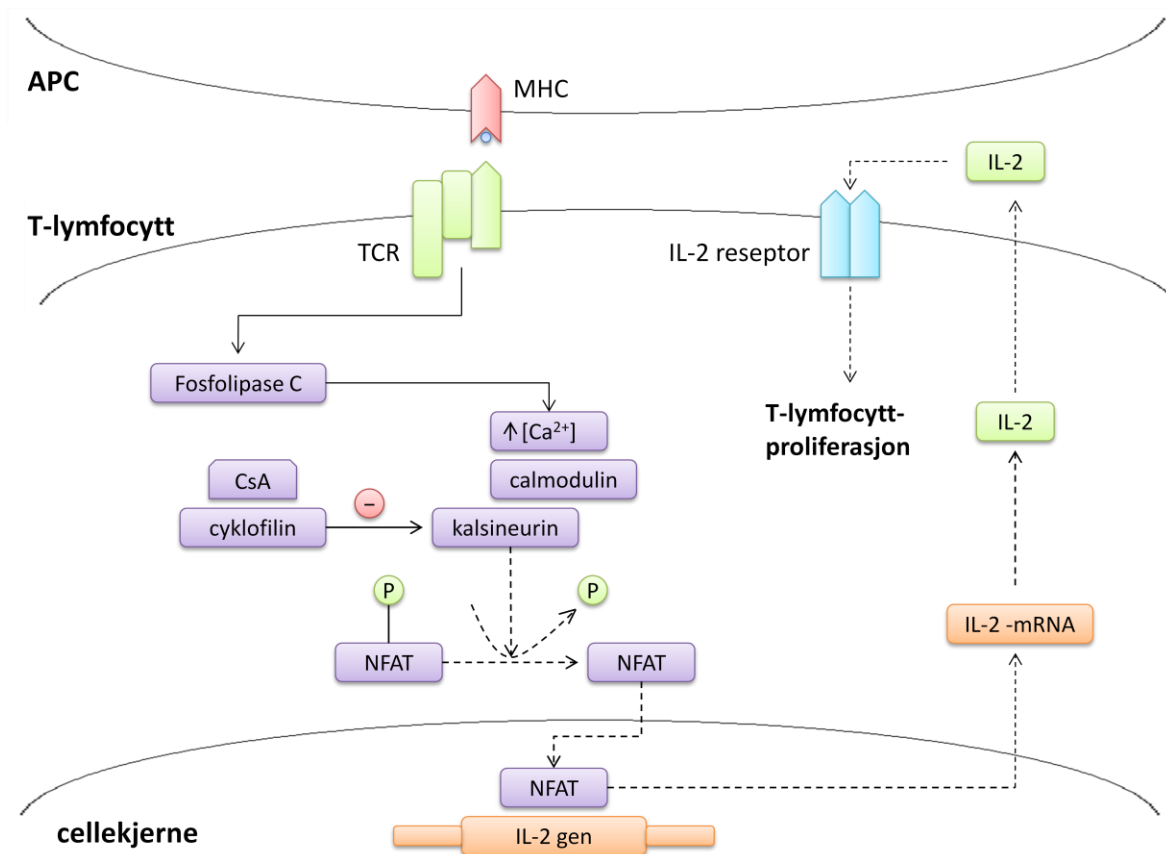
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
CsA	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
AM1	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	H
AM1c	CH <sub>2</sub> OH (MeBmt: cyclic)	CH <sub>3</sub>	H
AM4N	CH <sub>3</sub>	H	H
AM9	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
AM19	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	OH
AM1c9	CH <sub>2</sub> OH (MeBmt: cyclic)	CH <sub>3</sub>	OH

Figur 1.1. Strukturformelen og hovedmetabolittene til CsA ( $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ ). (Falck et al. 2007).

---

### 1.2.1 Virkningsmekanisme

CsA er et immunosuppressivt legemiddel som reduserer cytotoksisk aktivering av T-lymfocytter ved å hemme kalsineurin (Johnson 2006), virkningsmekanismen er vist skjematisk i Figur 1.2. T-lymfocytter er essensielle ved immunrespons på fremmede antigener. Makrofager, B-lymfocytter og dendrittceller er antigenpresenterende celler med hovedhistokompatibilitetskompleks (MHC)-molekyler. Antigener blir tatt opp av de antigenpresenterende cellene og presentert av MHC-molekylene for T-lymfocytreseptorene (TCR), som finnes på overflaten av T-lymfocytene. TCR identifiserer det fremmede antigenet og dette fører til en omfattende intracellulær signalisering. Kinaser fosforylerer og aktiverer fosfolipase C, som fører til frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$  fra endoplasmatisk retikulum, før kalsiumet binder seg til calmodulin og aktiverer den kalsiumavhengige fosfatasen kalsineurin (Dunn *et al.* 2001; Halloran 2001). CsA binder seg til cyklofilin og danner et kompleks, som hemmer kalsineurins normale defosforylering av nukleærfaktor for aktiverte T-lymfocytter (NFAT) (Handschumacher *et al.* 1984; Halloran *et al.* 1999; Halloran 2001). Ettersom defosforylert NFAT translokeres inn i kjernen (Halloran 2001), hvor den initierer gentranskripsjon av interleukin 2 (IL-2) (Elliott *et al.* 1984), vil CsA hemme IL-2-transkripsjon ved at NFAT ikke klarer å komme seg inn i kjernen. Dette fører igjen til en nedsatt T-lymfocytproliferasjon og en redusert/inaktivert immunrespons.



Figur 1.2. Virkningsmekanismen til CsA. Et fremmed antigen blir tatt opp i en APC og vist frem til TCR ved hjelp av MHC- molekyler. Kinaser fosforylerer og aktiverer fosfolipase C, og  $\text{Ca}^{2+}$  blir frigjort fra endoplasmatisk retikulum.  $\text{Ca}^{2+}$  binder seg til calmodulin og aktiverer kalsineurin. CsA binder seg til cyklofilin og danner et kompleks, som hindrer defosforylering av NFAT. Ettersom NFAT ikke kommer seg inn i kjernen hindres gentranskripsjonen av IL- 2 og det resulterer i en hemming av T-lymfocytproliferasjonen og derfor immunresponsen. CsA= ciklosporin A, APC= antigenpresenterende celle, TCR= T-lymfocytreseptor, MHC- molekyl= hovedhistokompatibilitetskompleks, NFAT= nukleærfaktor for aktiverte T-lymfocytter, IL-2= interleukin 2. Modifisert fra (Falck 2008).

### 1.2.2 Bivirkninger og toksisitet

Vanlige bivirkninger ved bruk av CsA er nedsatt nyrefunksjon, tremor, hypertrikose, hypertensjon, hyperlipidemi, gingival hyperplasi og økt mottakelighet for infeksjoner (SPC. 2010). Rundt 50 % av alle nyretransplanterte opplever hypertensjon, mens dette inntreffer hos nesten alle hjertetransplanterte (Krensky *et al.* 2006). I tillegg til hypertensjon er dyslipidemi en bivirkning (Kuster *et al.* 1994), hvor kombinasjonen av disse kan medføre økt risiko for kardiovaskulære hendelser. En hyppig tilstand en

---

tid etter hjertetransplantasjon er graftsklerose og utvikling av diffus koronarsykdom i transplantatet, som igjen kan føre til akutt hjerteinfarkt og graftsvikt (Kløy *et al.* 1998). Utvikling av svekket glukosetoleranse, diabetes mellitus, temporær renal hypoperfusjon og kronisk nefrotoksisitet er også alvorlige bivirkninger ved bruk av CsA (Bennett *et al.* 1996; Hansen *et al.* 1997; Dunn *et al.* 2001; Olyaei *et al.* 2001). Hjertetransplanterte er spesielt utsatt for nefrotoksisitet, og det er sett at i løpet av en 10 års periode fikk 10 % terminal nyresvikt (Myers og Newton 1991). Ved bruk av CsA for transplantasjoner er det i tillegg en økt risiko for kreft, hvor hudkreft er mest vanlig (Taylor *et al.* 2005). Det er vist at hjertetransplanterte har signifikant høyere risiko for hudkreft enn nyretransplanterte (Jensen *et al.* 1999).

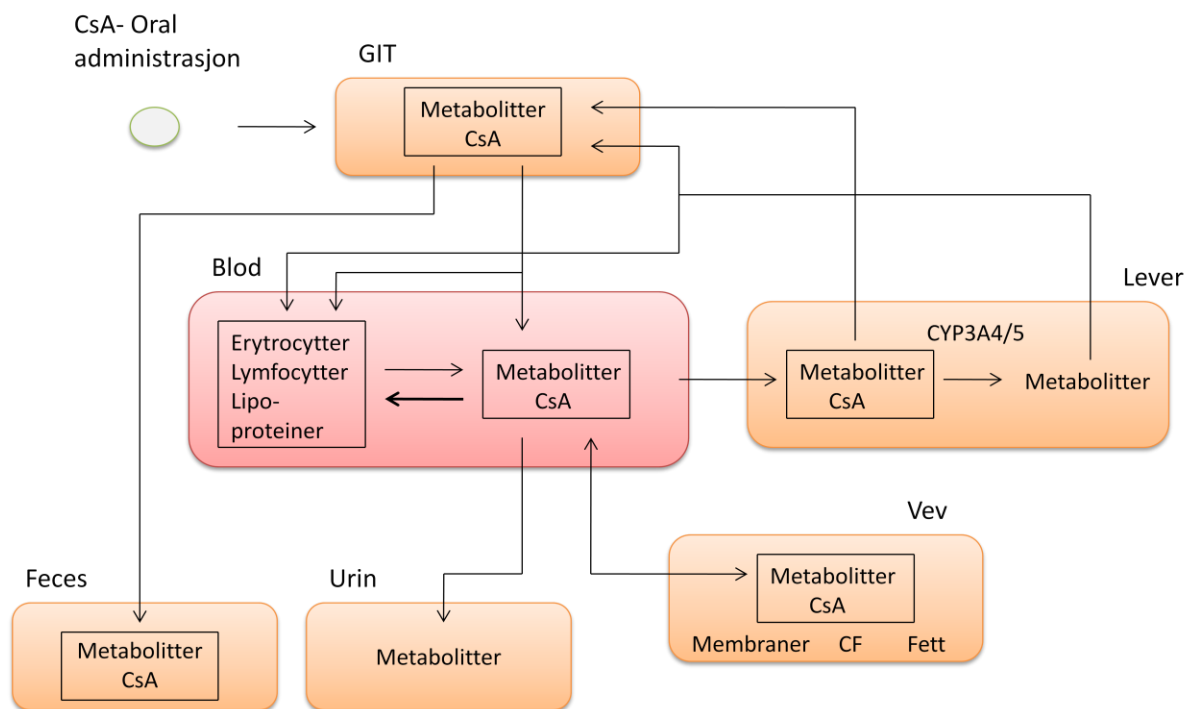
### **1.2.3 Farmakokinetikk**

CsA er et lipofilt legemiddel med en molekylvekt på 1202,6 Da (Fahr 1993; Falck *et al.* 2007). Den orale formuleringen av CsA som brukes i dag er Sandimmun Neoral<sup>®</sup> som er en mikroemulsjonsformulering med relativt lav variabilitet av de farmakokinetiske parametrene (SPC. 2010). Formuleringen gir doselineær CsA-eksponering og en biotilgjengeligheten på cirka 30-60 %.

#### **Absorpsjon**

CsA blir absorbert i gastrointestinaltrakten og hovedsakelig i tynntarmen (Drewe *et al.* 1992), Figur 1.3. CsA har stor variasjon i absorpsjonen, noe som er en risikofaktor for reaksjon (Kahan *et al.* 1996). Ettersom Sandimmune Neoral<sup>®</sup> er en emulsjon er absorpsjonen i liten grad avhengig av andelen galle (Mueller *et al.* 1995), og påvirkes dermed i liten grad av samtidig matinntak. Ved oral administrasjon av CsA oppnås maksimal konsentrasjon etter 1,5 til 2 timer (Noble og Markham 1995).





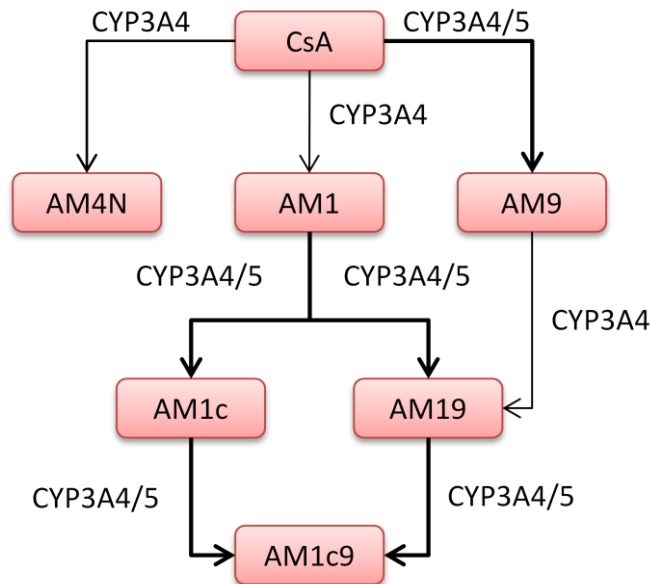
*Figur 1.3 En skjematisk oversikt over absorpsjon, distribusjon og eliminasjon til CsA og metabolittene i kroppen. CsA absorberes hovedsaklig i tyntarmen, hvor noe av CsA blir metabolisert. I fullblod er 41 -58 % av CsA assosiert med erytrocyttene, og 4-9 % i lymfocytene. I plasma er 85-90 % av CsA bundet til lipoproteiner (hovedsakelig HDL). CsA og metabolittene blir tatt opp i lever og vev, og elimineres hovedsakelig via gallen til feces. CsA= ciklosporin A, GIT= gastrointestinaltrakt, CF= cyklofilin, HDL= høytetthetslipoproteiner. Modifisert fra (Fahr 1993).*

## Distribusjon

Distribusjonen til CsA er vist skjematisk i Figur 1.3. CsA distribueres i stor grad ekstracellulært, med et distribusjonsvolum ved steady state på 3 til 5 L/kg etter intravenøs administrasjon (Dunn *et al.* 2001). I fullblod er 41 -58 % av CsA assosiert med erytrocyttene, og 4-9 % i lymfocytene (SPC. 2010). I plasma er 85-90 % av CsA bundet til lipoproteiner, hvor de fleste av disse er høytetthetslipoproteiner (HDL), og teoretisk sett kan derfor lavt kolesterol assosieres med høyere fri fraksjon av CsA (Akhlaghi *et al.* 1997; Johnson 2006). Ettersom CsA har svært lipofile egenskaper akkumuleres det i stor grad i lever og fettvev.

## Metabolisme

CsA metaboliseres hovedsakelig i lever og tarm via cytokrom P450 3A (CYP3A) til over 30 metabolitter (Christians og Sewing 1993), se Figur 1.4. Metabolismen skjer via oksidative prosesser som hydroksylering, karboksylering, demetylering og syklisering. Hovedmetabolittene til CsA er primærmetabolittene AM1, AM9 og AM4N, og sekundærmetabolittene AM1c, AM1c9 og AM19. Isoenzymet CYP3A4 står for mesteparten av metabolismen (Dai *et al.* 2004), og i tillegg bidrar isoenzymene CYP3A3 og CYP3A5 (Christians og Sewing 1995), se Figur 1.4. CYP3A5 utviser polymorfisme, hvor *CYP3A5\*3* og *CYP3A5\*2* er de vanligste allelene i kaukasiere (van Schaik *et al.* 2002). *CYP3A5\*3* og *CYP3A5\*2* uttrykker ikke funksjonelt CYP3A5 (Kuehl *et al.* 2001). Det er kun personer med minst et *CYP3A5\*1*-allel som uttrykker relevante mengder CYP3A5 (Kuehl *et al.* 2001). CsA blir brutt ned av CYP3A4 og CYP3A5 til hovedmetabolittene som vist i Figur 1.4. Personer med *CYP3A5\*1* vil få økt dannelse av AM9, AM19 og AM1c9 (Dai *et al.* 2004). CYP3A4 utviser ikke polymorfisme.



Figur 1.4 Metabolisme av CsA via CYP3A4 og CYP3A5. CsA metaboliseres til primærmetabolittene AM4N, AM1 og AM9, som videre metaboliseres til sekundærmetabolittene AM1c, AM19 og AM1c9. CsA= ciklosporin A. Modifisert fra (Christians og Sewing 1993; Falck 2008).

---

Den sykliske peptidstrukturen til CsA er relativt resistent mot metabolisme, slik at det er sidekjedene som primært modifiseres (Johnson 2006). Det er blitt vist at metabolittene til CsA er generelt sett mindre toksiske enn CsA (Copeland *et al.* 1990), men de sekundære metabolittene er blitt relatert til nedsatt nyrefunksjon. AM19 er foreslått brukt som biomarkør for nedsatt nyrefunksjon i nyretransplanterte pasienter (Kempkes-Koch *et al.* 2001), og studier er gjennomført som støtter dette (Falck *et al.* 2008a; Falck 2009). Det er også funnet indikasjoner på at hjertetransplanterte pasienter med redusert nyrefunksjon har et endret metabolittmønster (Falck 2009). Konsentrasjonen av metabolittene AM1, AM9, AM1c, AM1c9 og AM19 viste en tendens til å være høyere hos pasienter med nedsatt nyrefunksjon sammenlignet med pasienter med stabil nyrefunksjon, og AM19 ble funnet å avvike mest.

### **Eliminasjon**

Både CsA og metabolittene elimineres hovedsakelig via gallen til feces (SPC. 2010), se Figur 1.3. Ved oral administrasjon utskilles 6 % i urinen og mindre enn 1 % utskilles uforandret i urin. Generelt har blodkonsentrasjoner av CsA en bifasisk eliminasjon (Dunn *et al.* 2001). Den initielle eliminasjonshalveringstiden er rapportert til å være 1,2 timer i gjennomsnitt (Dunn *et al.* 2001), mens terminal halveringstid varierer mellom 6,3 – 20,4 timer, avhengig av metode benyttet og populasjon undersøkt (SPC. 2010). Ettersom CsA utskilles i liten grad via nyre er dosetilpasning ikke nødvendig for pasienter som får dialyse eller har nyresvikt (Krensky *et al.* 2006).

### **P-glykoprotein**

P-glykoprotein (P-gp) er en multisubstratpumpe som beskytter cellene mot potensielt skadelige stoffer. Pumpen er et transportprotein i klassen ABC-transportører som kodes av *ABCB1*-genet (Ambudkar *et al.* 2006). Ekspresjonen av P-gp er høy i enkelte celletyper i lever, pankreas, nyre og tarm (Thiebaut *et al.* 1987), og det er vist at CsA virker som et substrat og en hemmer for P-gp (Saeki *et al.* 1993). I lymfocytter til nyretransplanterte er ekspresjon av *ABCB1*-genet funnet å være

---

tilstedet, noe som kan medføre en endret effluks av CsA slik at den immunosuppressive effekten kan reduseres (Götzl *et al.* 1995). Ettersom CsA er et P-gp-substrat, kan variabel P-gp-kapasitet være en medvirkende årsak til ulik effekt av CsA for ulike pasienter (Molden 2004). *ABCB1* er et polymorft gen med flere enkelt nukleotidpolymorfismer (SNP) som kan påvirke P-gp-aktiviteten. En *TTT*-haplotype (*1236T*, *2677T* og *3435T*) er foreslått å ha svekket transportaktivitet (Burckart og Liu 2006).

#### 1.2.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Ved legemiddelbehandling med CsA er Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) nødvendig, dette for å sikre optimal dosering for hver enkelt pasient. Det er vist at effekten til CsA korrelerer med fullblodskonsentrasjonen, noe som gjør TDM mulig (Keown *et al.* 1981). TDM av CsA er tiltrengt fordi det er et legemiddel med høy inter- og intraindividuell variabilitet i farmakokinetikken, i tillegg har CsA et smalt terapeutisk vindu. Konsentrasjoner av CsA over det terapeutiske vinduet kan føre til nyretoksisitet, hypertensjon, utvikling av diabetes og dyslipidemi, mens konsentrasjoner under det terapeutiske vinduet øker risikoen for rejeksjon.

TDM ble innført i 1986, hvor blodkonsentrasjonen ble målt i forkant av en gitt dose ( $C_0$ ). Dette viste seg å ha variabelt klinisk utbytte, og det ble senere vist at  $C_0$  ikke reflekterer arealet under konsentrasjonstidskurven (AUC) for individuell eksponering av CsA (Mahalati *et al.* 1999). Fullstendige AUC-målinger krever at det tas flere blodprøver i et doseintervall, det er derfor mer omfattende og tidkrevende enn en enkelt måling. Det er blitt gjort en klinisk studie for å finne det tidspunktet som best predikerer AUC hos hjertetransplanterte (Cantarovich *et al.* 2003). Det ble vist at konsentrasjonen 2 timer etter gitt dose ( $C_2$ ) er det målingspunktet som best predikerer AUC i løpet av de 12 første timene etter gitt dose. Det er undersøkt om det er en økt klinisk sammenheng mellom  $C_2$ -monitorering og fravær av rejeksjon, sammenlignet med bruk av  $C_0$ -monitorering hos hjertetransplanterte (Solari *et al.* 2005). Studien inneholdt for få rejeksjoner til å konkludere med at forskjellen var signifikant, men

---

det ble vist en trend mellom  $C_2$  og rejeksjon. Hos hjertetransplanterte har  $C_2$ -monitorering i tillegg andre kliniske fordeler i forhold til  $C_0$ -monitorering, dette ble observert i en studie hvor det ble sett på bevaring av nyrefunksjon og hyppighet av infeksjoner (Delgado *et al.* 2002).

### 1.3 Bakgrunn for studien

CsA er en viktig del av den immunosuppressive behandlingen ved organtransplantasjon, men er assosiert med flere alvorlige bivirkninger som beskrevet i 1.2.2 *Bivirkninger og toksisitet*. Farmakokinetikken til CsA har en stor inter- og intraindividuell variabilitet og har et smalt terapeutisk vindu, dette gjør TDM nødvendig.

Rutinemålinger av CsA blir i dag utført i fullblod, mens det er blitt vist at CsA utøver sin virkning intracellulært i T-lymfocytene (Liu *et al.* 1991). I tillegg har det ved akutt rejeksjon hos nyretransplanterte blitt vist en økt aktivitet av P-gp og derfor en mulig lavere intracellulær konsentrasjon av CsA (Götzl *et al.* 1995). Det ble derfor foreslått at det å måle CsA intracellulært i T-lymfocytter kan gi mer betydningsfull informasjon om den immunosuppressive effekten av CsA enn målingene i fullblod. En spesifikk metode ble utviklet for å bestemme konsentrasjonen av CsA og seks av hovedmetabolittene både intracellulært og i fullblod (Falck *et al.* 2007). Videre ble en studie gjennomført med nyretransplanterte pasienter, hvor det ble funnet en generelt lavere konsentrasjon av CsA intracellulært hos de pasientene som fikk rejeksjon enn hos pasientene som ikke fikk rejeksjon (Falck *et al.* 2008c). Det ble også sett at den intracellulære konsentrasjonen av CsA senkes signifikant 3 dager før en rejeksjonshendelse (Falck *et al.* 2008c). Samtlige pasienter i studien ble genotypet for *CYP3A5\*2*, *CYP3A5\*3* og P-gp haplotype- *TTT*, hvor kun 2 av 20 hadde *CYP3A5\*1/\*3* og kun 1 av 20 hadde P-gp haplotype- *TTT*. En annen årsak til redusert konsentrasjon av CsA intracellulært har blitt foreslått å være høye hematokrittverdier (Barbari *et al.* 2006).

---

Ettersom intracellulære målinger har gitt oppløftende resultater for nyretransplanterte pasienter ønskes det å undersøke om man med intracellulære målinger kan finne tilsvarende biomarkører hos hjertetransplanterte pasienter.

## 1.4 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven er å sammenligne konsentrasjonen av CsA intracellulært og i fullblod med klinisk effekt, for slik å undersøke om intracellulære målinger kan forutsi rejeksjon hos pasienter. Dersom det finnes en slik biomarkør vil intracellulære målinger i fremtiden kunne redusere antall rejeksjonsepisoder.

---

## 2. Materiale og metoder

### 2.1 Pasienter og prøvemateriale

I studien var det inkludert 10 hjertetransplanterte pasienter, derav 8 menn og 2 kvinner, med en gjennomsnittsalder på  $52 \pm 12$  år og en gjennomsnittsvikt på  $76,7 \pm 18,0$  kg. Pasientene ble inkludert i studien  $17 \pm 6$  dager etter transplantasjonen ble gjennomført. De ble fulgt opp ved Rikshospitalet i den tidlige posttransplanterte perioden på  $70 \pm 8$  dager. I denne perioden ble alle pasientene behandlet med CsA, mykofenolatmofetil og steroider. Når pasientene var inne til rutinebesøk, alt fra ingen og opptil fire ganger i uken, ble det samtidig tatt blodprøver for måling av CsA og metabolittene både i fullblod og intracellulært i T-lymfocytene. Pasientene ble i tillegg genotypet for P-gp (homozygot haplotype *TTT*) og CYP3A5 (\*2 og \*3).

### 2.2 Analysemetoder

CsA ble analysert både i fullblod og i isolerte T-lymfocytter. Det ble brukt proteinfelling og fast-fase-ekstraksjon ved prøveopparbeidelse.

Konsentrasjonsbestemmelsen av CsA og metabolittene, både i fullblod og intracellulært i T-lymfocytene, ble gjort ved anvendelse av en metode med væskerkromatografi koblet med tandem-massespektrometri (LC-MS/MS-metode). Metodene som ble brukt er tidligere validert (Falck *et al.* 2007).

#### 2.2.1 Isolering av T-lymfocytter

Det ble isolert T-lymfocytter fra pasientene hver gang de var inne til rutinebesøk. Det ble også isolert T-lymfocytter fra friske frivillige for å ha cellesuspensjon som matriks, ved opparbeidelse av standardkurver. Metoden er beskrevet skjematisk i Figur 2.1. Isoleringen ble gjort ved hjelp av PrepaCyte<sup>®</sup>-TC cellesepareringsmedium.

---

### **PrepaCyte<sup>®</sup>-TC cellesepareringsmedium**

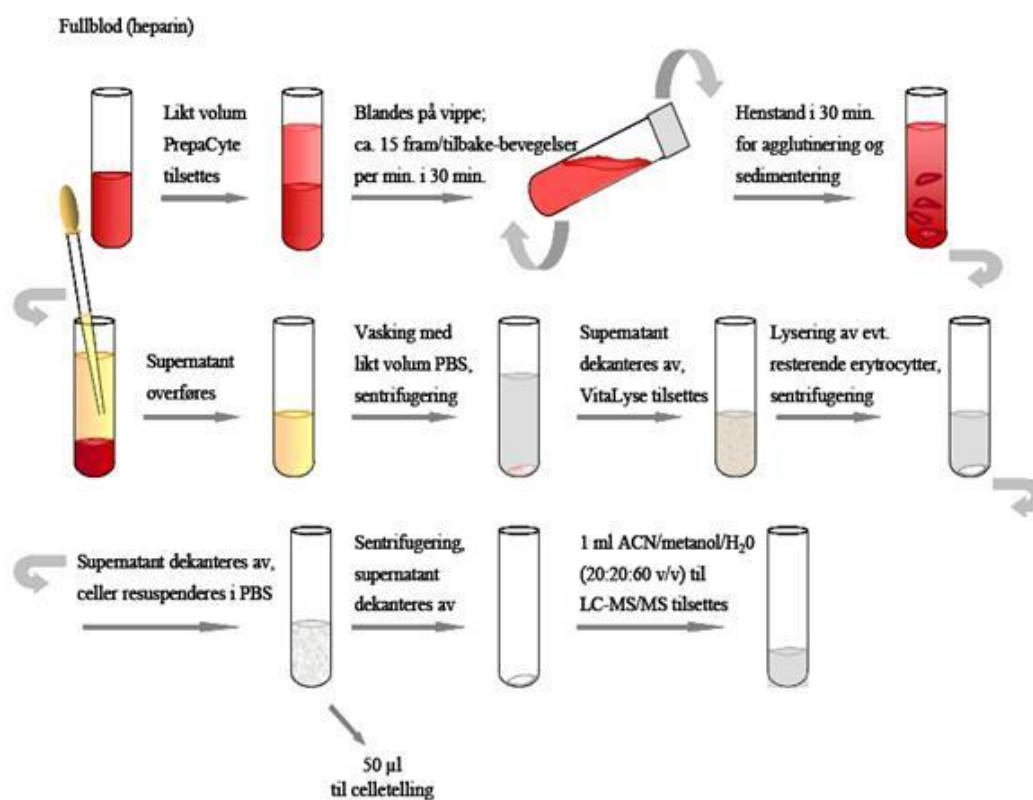
PrepaCyte<sup>®</sup>-TC baserer seg på negativ isolering, som innebærer at alt annet enn de ønskede T-lymfocytterne blir felt ut. PrepaCyte<sup>®</sup>-TC inneholder forskjellige antistoffer med affinitet til spesifikke antigener som befinner seg på overflaten av erytrocytter, B-lymfocytter og modne myeloidceller som granulocytter, monocytter og plater. Dette fører til en agglutinerings av disse, mens T-lymfocytterne blir værende igjen i supernatanten (Falck *et al.* 2007).

### **Beskrivelse av metoden**

Det ble overført 7 mL ferskt fullblod til et stort sliffør, før 7 mL romtemperert PrepaCyte<sup>®</sup>-TC ble tilsatt. Fullblod og PrepaCyte<sup>®</sup>-TC ble blandet ved 15 frem/tilbake bevegelser per minutt i 30 minutter på en vippe. Rørene ble deretter hensatt i 30 minutter uten propp, for agglutinerings og sedimentering av alle komponenter unntatt T-lymfocytterne. Supernatanten med T-lymfocytterne ble så overført til et annet sliffør. Fosfatbufret saltvann (PBS) ble tilsatt slifføret for vask, i samme volum som supernatanten, med en påfølgende lett blanding. Blandingen ble sentrifugert på 540 g i 7 minutter. Supernatanten som inneholdt PBS og uønskede cellekomponenter, ble tatt ut ved hjelp av en lang pasteurpipette. Cellepelletten ble tilsatt 10 mL av lyseringsbufferen Vitalyse<sup>™</sup>, for lysering av eventuelle erytrocyttrester, dette ble så blandet ved å vippe fram og tilbake. Rørene ble hensatt i 15 minutter, før de ble sentrifugert på 540 g i 7 minutter. Supernatanten med Vitalyse<sup>™</sup> og mulige erytrocyttrester ble fjernet, og 7 mL PBS ble tilsatt cellepelletten for vask, før vipping og sentrifugering på 540 g i 7 minutter. Supernatanten ble fjernet og bunnfallet ble tilsatt nye 7 mL PBS og blandet ved vipping. Av den opprinnelige cellepopulasjonen inneholdt supernatanten > 97 % lymfocytter, hvorav 88- 96 % var T-lymfocytter (Collins 2000). 50 µL av cellesuspensjonen ble pipettert ut i eppendorfrør for celletelling. Den resterende cellesuspensjonen ble sentrifugert på 540 g i 7 minutter og supernatanten ble fjernet. Cellepelletten ble tilsatt 1 mL ACN/MeOH/deionisert H<sub>2</sub>O (20%/20%/60% v/v), som førte til lysering av cellene,



dette ble deretter blandet på en Whirlmikser. Cellesuspensjonen ble så oppbevart ved -20 °C frem til prøveopparbeidelse ved fast-fase-ekstraksjon.



Figur 2.1. Metodebeskrivelse av T-lymfocyttisolering. Nærmere forklaring er gitt i teksten. Figuren er modifisert fra (Guldseth 2005).

## 2.2.2 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon ble utført for å oppkonsentrere og rense CsA og de respektive metabolittene fra fullblod og isolerte T-lymfocytter. En oppkonsentrering var nødvendig ettersom konsentrasjonsnivåene av CsA og metabolittene i fullblod og i T-lymfocytene var forholdsvis lave i pasientprøvene, for anvendelse av denne typen LC-MS/MS-apparatur. Ved fast-fase-ekstraksjon ble det i tillegg oppnådd opprensning av prøvene, som var nødvendig for å unngå forurensing av LC-MS/MS-apparaturen.

---

### **Prøveopparbeidelse for fullblod og T-lymfocytter**

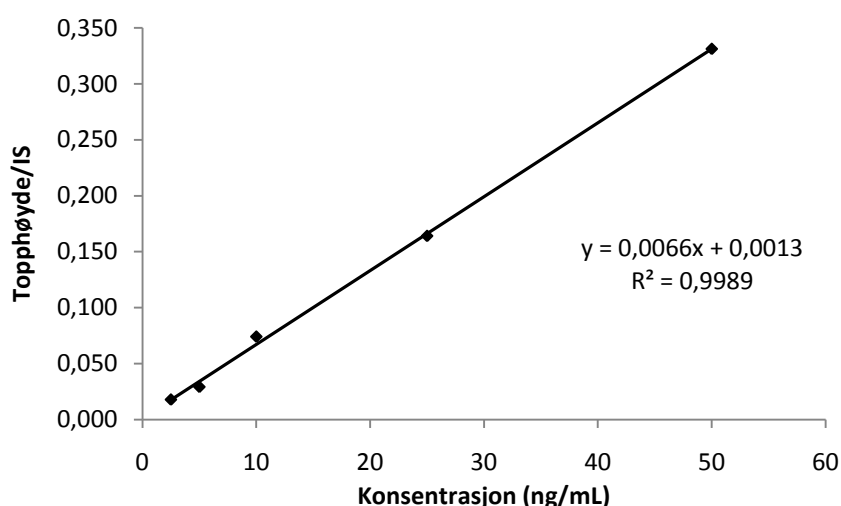
Pasientprøver og stamløsninger ble tint ved romtemperatur umiddelbart før prøveopparbeidelse. Det ble tilsatt 50 µL av 0,5 µg/mL Ciklosporin C (CsC) i ACN/MeOH/deionisert H<sub>2</sub>O (20%/20%/60% v/v) som internstandard (IS) til standardkurveprøver, kvalitetskontrollprøver (QC-prøver) og pasientprøver. Standardkurvene og QC-prøvene for både fullblod og T-lymfocytter ble lagd ved å tilsette kjent konsentrasjon av CsA og metabolitter til 200 µL blank matriks. Til pasientprøvene ble det på samme måte som ved standardkurveprøvene og QC-prøvene tatt ut 200 µL, av henholdsvis fullblod eller celleduspansjon, til prøveopparbeidelsen. Det ble tilsatt 500 µL MeOH for proteinfelling. Etter å ha virvlet på whirlmikseren i tilnærmet 1 minutt ble det utført en sentrifugering på 12000 g i 30 minutt ved 4 °C. Supernatanten ble så fjernet fra pelleten og tilsatt 100 µL MeOH, for økt volum. Blandingen ble så virvlet på en whirlmikser og sentrifugert på 12000 g i 15 minutt ved 4 °C. Supernatanten fra denne sentrifugeringen ble blandet med 500 µL H<sub>2</sub>O på kolonnen og sugd gjennom en allerede kondisjonert fast-fase-kolonne av typen Water Oasis<sup>®</sup> HLB (hydrofil-lipofil-balansert kolonne). Fast-fase-ekstraksjonen ble startet med kondisjonering av kolonnen med 1 mL MeOH som ble vasket ut med 1 mL H<sub>2</sub>O. Utvasking av forurensning fra prøvene på kolonnene ble utført med 65 % MeOH, mens elueringen ble utført med 1 mL 90 % MeOH. Deretter ble prøvene dampet til tørrhet i en SpeedVac<sup>®</sup>, ved 60 °C. Prøvene ble så reløst i 250 µL mobilfase, med en sammensetning av 65 % Mobilfase A og 35 % Mobilfase B, før de ble analysert på LC-MS/MS-apparaturen.

---

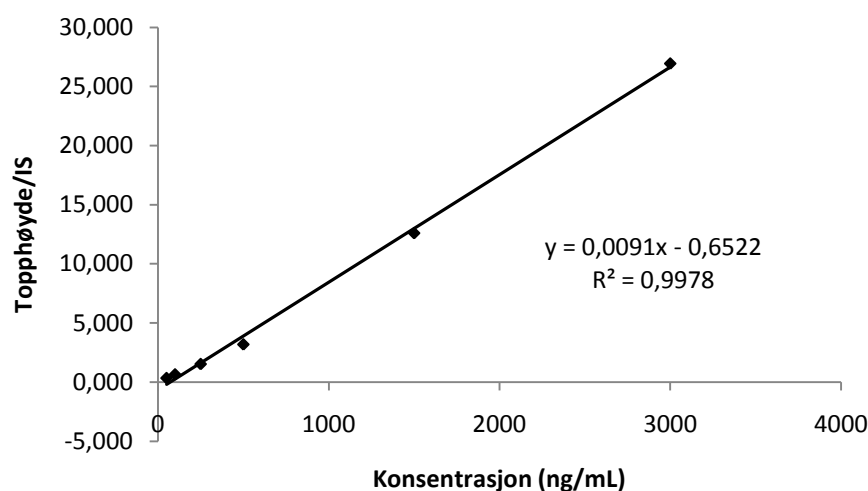
### Standardkurver og QC-prøver for fullblodsmaterialet

I prøveopparbeidelsen av standardkurver og QC-prøver for fullblodsmaterialet ble det brukt løsninger med CsA, AM1, AM9 og AM1c i ACN/MeOH/deionisert H<sub>2</sub>O (20%/20%/60% v/v). Konsentrasjonene på løsningene var på henholdsvis 0,01 – 0,1 – 1 og 5 µg/mL. Standardkurvene for fullblodsmaterialet ble lagd med 10 forskjellige konsentrasjoner på henholdsvis 2,5 – 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 250 – 500 – 1500 og 3000 ng/mL. Laveste konsentrasjon i standardkurven representerte nedre kvantifiseringsgrense. Det har i tidligere studier blitt funnet at det er mest tilfredsstillende å inndelegge standardkurvene i to konsentrasjonsintervaller, 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL (Falck *et al.* 2007). Dette ble derfor anvendt i denne studien. Representative CsA-standardkurver, med formler for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdier (regresjonskoeffisient-verdier), for fullblodsmaterialet er vist i Figur 2.2. Samtlige standardkurver for CsA og metabolittene er vist i Appendiks, *Standardkurver for CsA og metabolittene i fullblod*. QC-prøvene ble lagd med en lav og en høy konsentrasjon på henholdsvis 150 ng/mL og 1000 ng/mL.

a)



b)



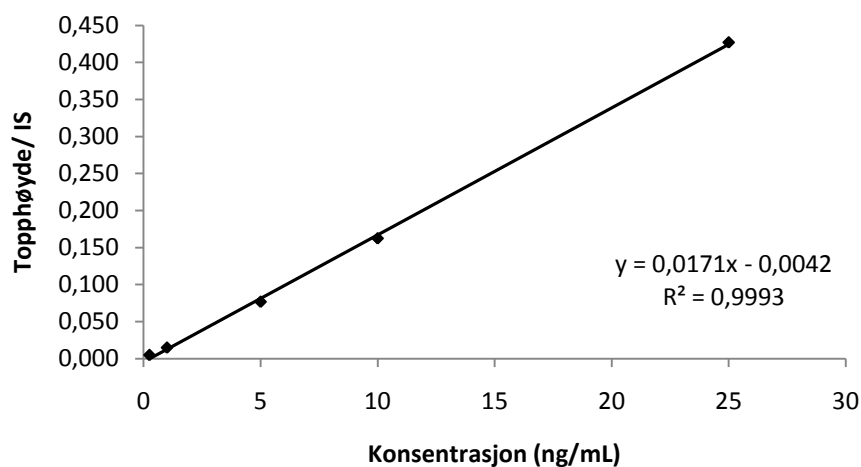
Figur 2.2 Representative CsA-standardkurver for fullblodsmaterialet ved konsentrasjoner på henholdsvis a) 2,5-50 ng/mL og b) 50-3000 ng/mL. Formlene for lineærregresjon og  $R^2$ -verdiene er vist i diagrammene. IS= internstandard,  $R^2$ = regresjonskoeffisient.

På grunn av manglende standarder for AM19, AM1c9 og AM4N ble disse ekstrapolert ved hjelp av en tidligere lagd standardkurve for AM19, AM1c9 og AM4N. På hvert konsentrasjonsnivå i denne standardkurven ble det funnet en faktor ut i fra forholdet mellom CsA-topphøyden og topphøydene til de respektive metabolittene. Innen samme metabolitt ble faktoren funnet til å være tilnærmet lik på de ulike konsentrasjonsnivåene. Det ble dermed benyttet en gjennomsnittsfaktor for hver enkelt metabolitt. Faktoren for hver enkelt metabolitt ble multiplisert med CsA-

topphøydene på hvert enkelt konsentrasjonsnivå i standardkurvene kjørt sammen med prøvene i denne studien, slik at estimerte standardkurver for AM19, AM1c9 og AM4N ble generert for hver analyse.

### Standardkurven og QC-prøver for T-lymfocyttematerialet

For T-lymfocyttematerialet ble det valgt å bruke kun en standardkurve for alle pasientprøvene. I prøveopparbeidelsen av standardkurven ble det brukt løsninger på henholdsvis 10 og 100 ng/mL CsA i ACN/MeOH/deionisert H<sub>2</sub>O (20%/20%/60% v/v). Standardkurven for T-lymfocyttematerialet ble lagd med 5 forskjellige konsentrasjoner på henholdsvis 0,25 – 1 – 5 – 10 og 25 ng/mL, som vist med formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi i Figur 2.3. Laveste konsentrasjon i standardkurven representerte nedre kvantifiseringsgrense. Ettersom konsentrasjonene ble valgt å gå opp til 25 ng/mL, ble denne standardkurven ikke delt inn i konsentrasjonsintervaller. QC-prøvene ble lagd med konsentrasjoner på 1 og 15 ng/mL.



Figur 2.3 Standardkurven for T-lymfocyttematerialet. Formelen for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi er vist i diagrammet. IS= internstandard, R<sup>2</sup>= regresjonskoeffisient.

---

### 2.2.3 LC-MS/MS-analyse

LC-MS/MS-analysene ble gjennomført med høytrykksvæsketromatografi (HPLC)-utstyr som besto av en Ultimate 3000 Autosampler og en LPG- 3000- pumpe, for nærmere oversikt over utstyr se Appendiks, *Utstyr*. HPLC- utstyret var koblet med massespektrometri, i form av en Finnigan LCQ<sup>TM</sup> DUO ionefelle.

#### Kromatografisk separasjon

De opparbeidede prøvene på 250 µL ble plassert i autosampleren, hvorav 100 µL av disse ble injisert. Den kromatografiske separasjonen ble utført av en omvendt-fase C8-kolonne med forkolonne. Kolonnene ble varmet opp til 65 °C i en kolonneovn. Mobilfasene som ble brukt under analysene var mobilfase A: ACN/20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>HCOO<sup>-</sup> pH 3,6 (20:80 v/v) og mobilfase B: ACN/20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>HCOO<sup>-</sup> (80:20 v/v). Gradientprogrammet startet med 65 % mobilfase A og 35 % mobilfase B. Andelen av mobilfase B ble økt fra 35 % til 40 % de første 7,5 minuttene. Deretter ble andelen mobilfase B økt fra 40 % til 65 % de neste 12,5 minuttene. I løpet av de neste 3 minuttene ble andelen mobilfase B økt til 100 %. Andelen mobilfase B ble så redusert raskt ned til 35 % igjen og det ble brukt 5,5 minutter på reekvilibrering. Den totale analysetiden per prøve ble derfor 28,7 minutter. Mobilfasene gikk utenom detektoren de første 5,5 minuttene og de siste 4,8 minuttene.

#### Massespektrometrisk deteksjon

Analyttene ble eluert inn i massespektrometeret etter sin hydrofilisitet, den mest hydrofile først, og kom derfor i rekkefølgen: AM1, AM9, AM1c, CsC og CsA.

Ioniseringsteknikken som ble brukt var kjemisk ionisasjon ved atmosfæretrykk (APCI). Den kromatografiske separasjonstiden ble delt inn i tre segmenter. Innenfor hvert segment ble det målt på ulike masse/ladnings-intervaller (m/z-intervaller). Det massespektrometriske systemet ble stilt inn på multiplere reaksjonsmonitorering (MRM), som betyr at det ble valgt ut forskjellige modermasser som ble kollidert og deretter ble det valgt noen fragmenter/datterioner som ble detektert. Nærmere beskrivelse av segmentene, kollisjonsenergiene og fragmenteringsovergangene for de

---

forskjellige analyttene er vist i Appendiks, *MS/MS- konfigurering for analyttene*. Intervallet for modermassen ble satt til  $m/z = 4,0$ , mens intervallet for datterionene ble satt til  $m/z = 3,0$ . Avlesningen og tolkingen av LC-MS/MS-analysene ble utført i dataprogrammet Xcalibur<sup>®</sup> versjon 2.0.7.

## 2.2.4 Genotyping og måling av genuttrykk

I forbindelse med studien ble det tatt fullblodsprøver (EDTA-etylendiamintetraeddiksyre) for bestemmelse av pasientenes genotyper av *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T*, *G2677A*, *G2677G* og *C3435T*) og *CYP3A5* (*CYP3A5\*2*, *C27289A* og *CYP3A5\*3*, *A6986G*). Tidligere rapporterte metoder og primersekvenser ble brukt for å bestemme mutasjonene med polymerasekjedereaksjon (PCR-restriksjonsenzym-fragmentlengde-polymorfisme) (Cascorbi *et al.* 2001; van Schaik *et al.* 2002). Metoden går ut på at spesielle enzymer klipper opp DNA, og gir DNA-fragmenter som blir separert ved elektroforese på 3 % agarose gel. For mer utfyllende informasjon, se (Falck *et al.* 2008b).

For pasientene i denne studien ble allelene *G2677A/T*, *C1236T* og *C3435T* av *ABCB1* bestemt for å kunne identifisere genotypen homozygot haplotype-*TTT*. Det ble i tillegg genotypet for allelene *CYP3A5\*2* og *CYP3A5\*3*. *CYP3A5\*1*-benevningen ble bruk for non-*\*2* og non-*\*3*.

---

## 3. Resultater

### 3.1 Demografisk og klinisk pasientdata

Det ble inkludert 10 pasienter i studien, 8 menn og 2 kvinner, hvor samtlige fullførte studien. Det ble observert reaksjonsepisoder hos 3 av pasientene, hvor den ene av de tre pasientene opplevde til sammen tre hendelser. Demografisk data for pasientene er gitt i Tabell 3.1 og klinisk data er gitt i Tabell 3.2.

*Tabell 3.1 Demografiske data for pasientene som deltok i studien.  $T_1$ = Tid fra HTx (hjertetransplantasjon) til første prøve i studien,  $T_{tot}$ = dager oppfulgt,  $T_R$ = reaksjonstidspunkt gitt som antall dager post HTx, SD= standardavvik, \* = påvist på 3 ulike tidspunkt.*

Pasient nr.	Kjønn	Alder (år)	Vekt (kg)	$T_1$	$T_{tot}$	Reaksjon	$T_R$	Annet
21	Mann	42	92	15	72	ja	44	
22	Kvinne	26	48	18	66	nei		
23	Mann	59	100	25	64	nei		Muskelkramper
24	Mann	44	81	14	71	nei		
25	Mann	55	92	14	84	ja	84	
26	Mann	53	87	24	63	nei		
27	Mann	63	82	27	58	nei		Hypertensjon og nyresvikt
28	Kvinne	49	49	8	67	nei		
29	Mann	65	66	13	77	ja *	45, 52, 59	
30	Mann	62	70	14	73	nei		
Gjennomsnitt $\pm$ SD:		52 $\pm$ 12	76,7 $\pm$ 18,0	17 $\pm$ 6	70 $\pm$ 8			



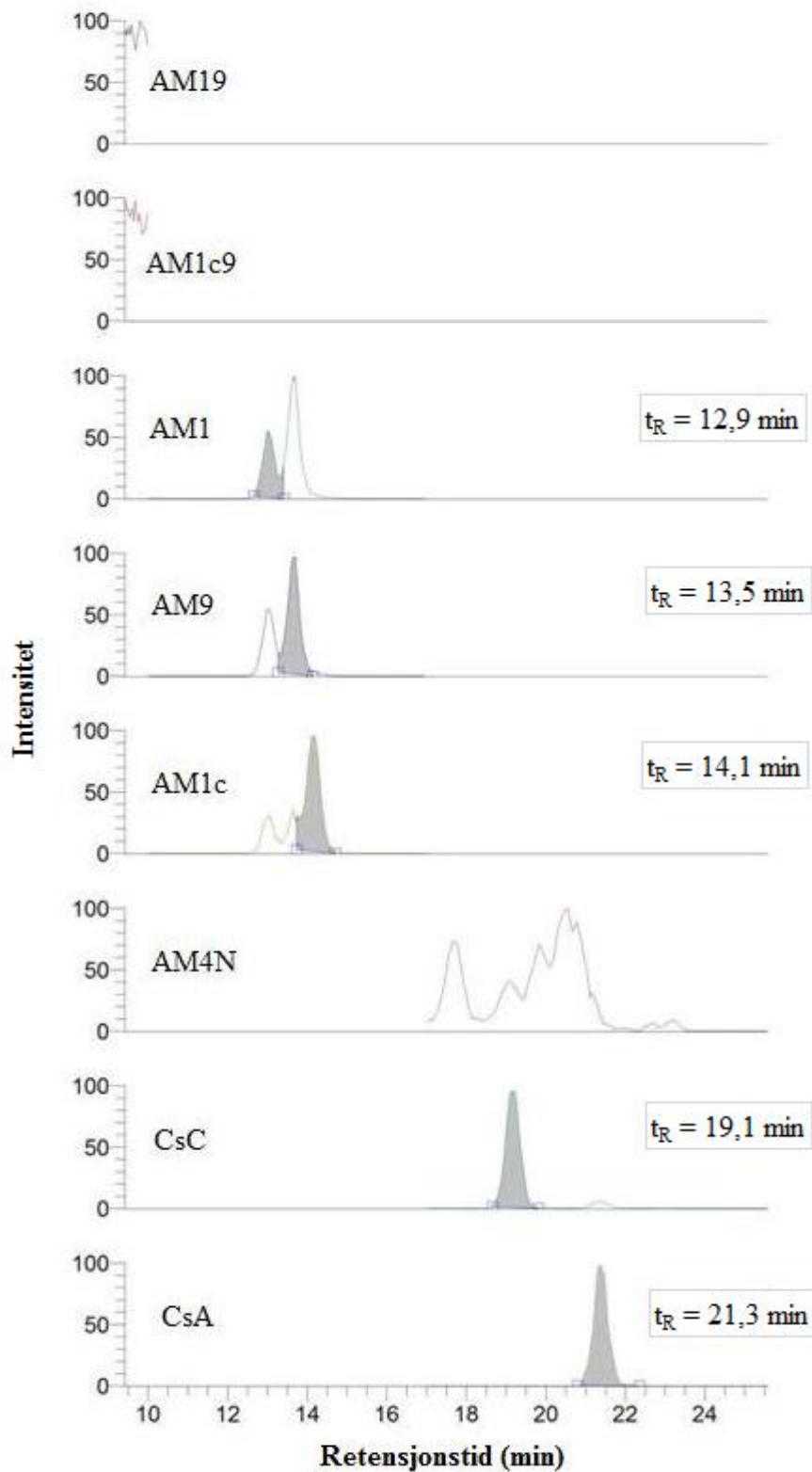
Tabell 3.2 Kliniske data for pasientene som deltok i studien, oppgitt som gjennomsnitt og standardavvik i løpet av oppfølgingstiden. CsA dose= ciklosporin A dose, CsA C<sub>0</sub>= konsentrasjon før neste dose, Pred dose= Prednisolon dose, Kreat= plasmakreatinin, Hct= hematokritt.

Pasient nr.	CsA dose (mg/dag)	CsA C <sub>0</sub> (µg/L)	Pred dose (mg/dag)	Kreat (µmol/L)	Urea (mmol/L)	Hct (%)
21	317 ± 41	274 ± 72	13,8 ± 2,7	98 ± 13	6,9 ± 1,2	34 ± 2
22	314 ± 17	191 ± 41	9,8 ± 0,5	112 ± 12	7,7 ± 1,5	32 ± 3
23	442 ± 22	258 ± 37	13,4 ± 2,7	129 ± 18	11,5 ± 1,4	34 ± 3
24	281 ± 52	268 ± 41	10,2 ± 2,4	87 ± 16	7,8 ± 2,0	36 ± 3
25	368 ± 42	231 ± 56	13,9 ± 3,8	123 ± 13	12 ± 2,3	39 ± 3
26	329 ± 23	199 ± 39	10,9 ± 1,9	188 ± 48	14,6 ± 5,5	39 ± 2
27	150 ± 11	171 ± 53	10,7 ± 2,8	234 ± 21	20,2 ± 3,9	32 ± 3
28	169 ± 11	182 ± 36	6,3 ± 1,2	92 ± 12	5,2 ± 1,0	28 ± 10
29	420 ± 18	219 ± 26	11,4 ± 2,1	101 ± 19	12,2 ± 2,6	39 ± 3
30	213 ± 23	233 ± 75	11,4 ± 2,0	88 ± 12	6,6 ± 0,8	40 ± 2

### 3.2 Massekromatogram av analyttene

Fullblods- og intracellulærkonsentrasjonene til CsA og metabolittene ble funnet ved hjelp av HPLC-utstyr koblet med massespektrometri. Et typisk massekromatogram fra en QC-prøve med CsA, metabolittene og CsC som internstandard i en konsentrasjon på 1000 ng/mL kan sees i Figur 3.1. Konsentrasjonene av AM1, AM9, AM1c, CsC og CsA ble funnet ved å integrere toppene som er markert med grått i figuren, mens retensjonstidene (t<sub>R</sub>) for de respektive analyttene er markert til høyre i figuren.

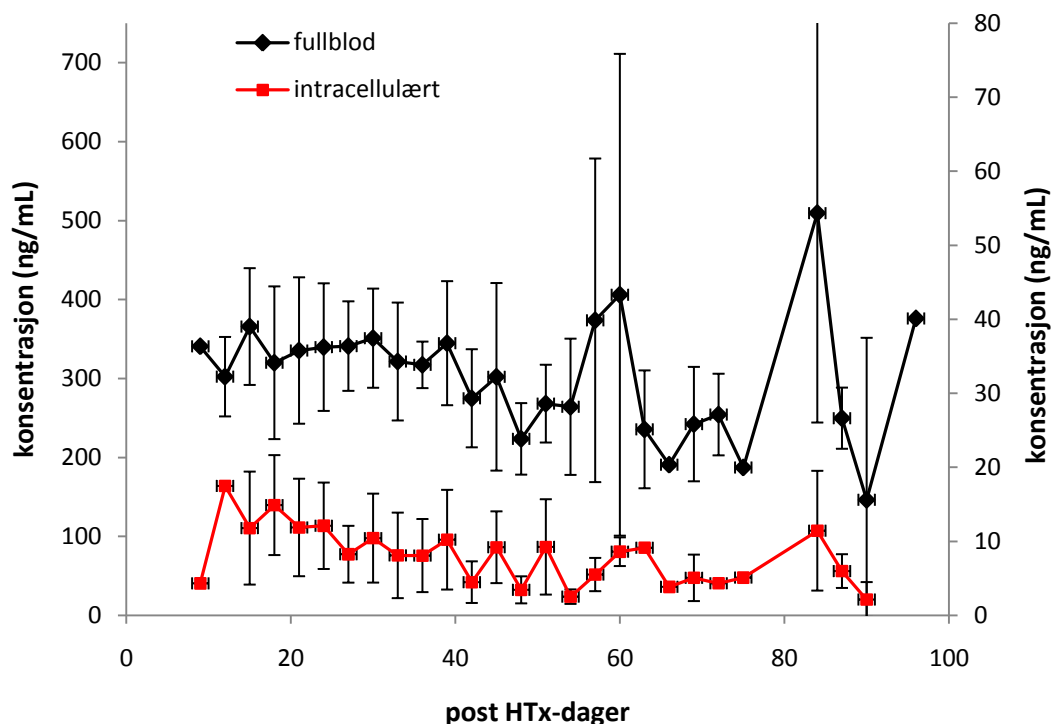
Alle QC-prøvene for det intracellulære materialet falt innenfor de forhåndsbestemte grensene på en tilfredsstillende måte. Intradagpresisjon for de intracellulære QC-prøvene på 1 ng/mL og 15 ng/mL ga en CV (variasjonskoeffisient) på henholdsvis 13,0 % og 15,5 %. For fullblodsmaterialet var det enkelte av begge de to konsentrasjonene på QC- prøvene som falt utenfor de forhåndsbestemte grensene. Dette gjaldt prøver hos 6 pasienter ved 150 ng/mL, og prøver hos 4 pasienter ved 1000 ng/mL. Dette ble likevel akseptert ettersom det samtidig med disse prøvene ble opparbeidet og analysert standardkurver. Intradagpresisjonen for fullblods-QC-prøvene på 150 ng/mL og 1000 ng/mL, som tilfredstilte begrensningene, hadde en CV på henholdsvis 15,0 % og 9,1 %.



Figur 3.1 Massekromatogram fra en 1000 ng/mL QC-prøve med analyttenes relative intensitet som funksjon av retensjonstid. Analyttene i QC-prøvene kommer i rekkefølgen: AM1, AM9, AM1c, CsC og CsA, hvor hver analytt er vist med sitt individuelle massekromatogram. Området for integrasjon er vist i grått.  $t_R$  = retensjonstid.

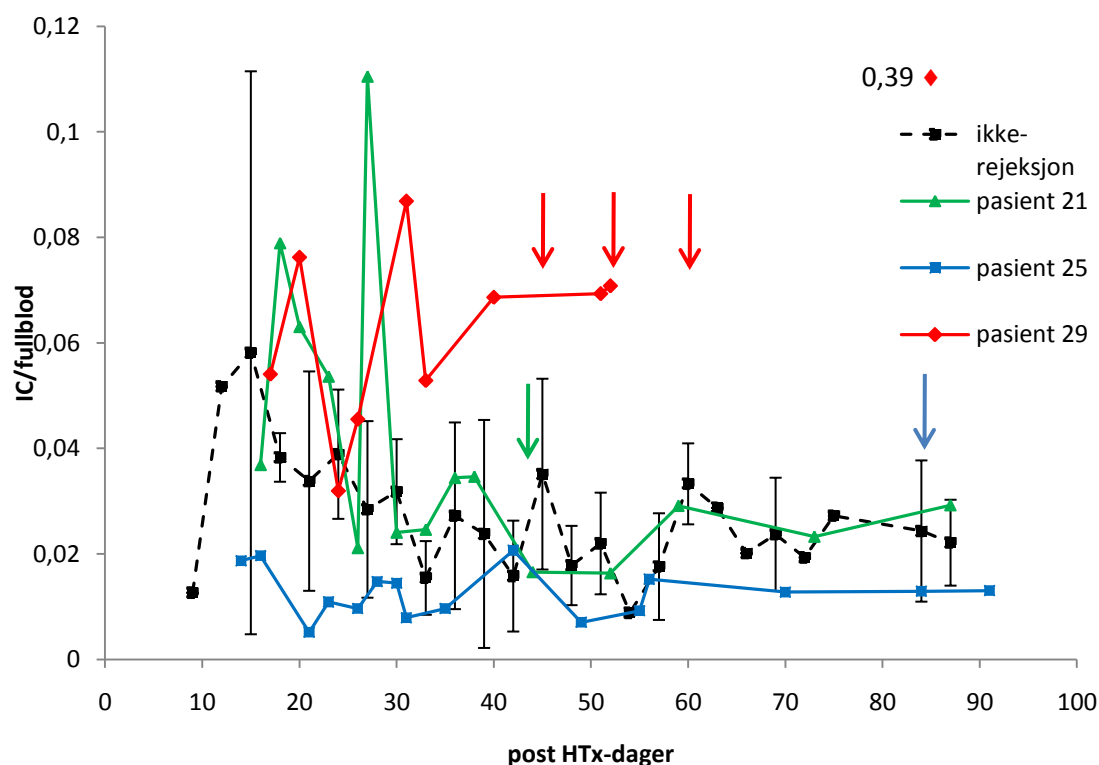
### 3.3 Fullblods- og intracellulærkonsentrasjoner

Det ble målt fullblods- og intracellulærkonsentrasjoner av CsA og metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM9, AM1c og AM4N til alle de 10 hjertetransplanterte pasientene som deltok i studien.



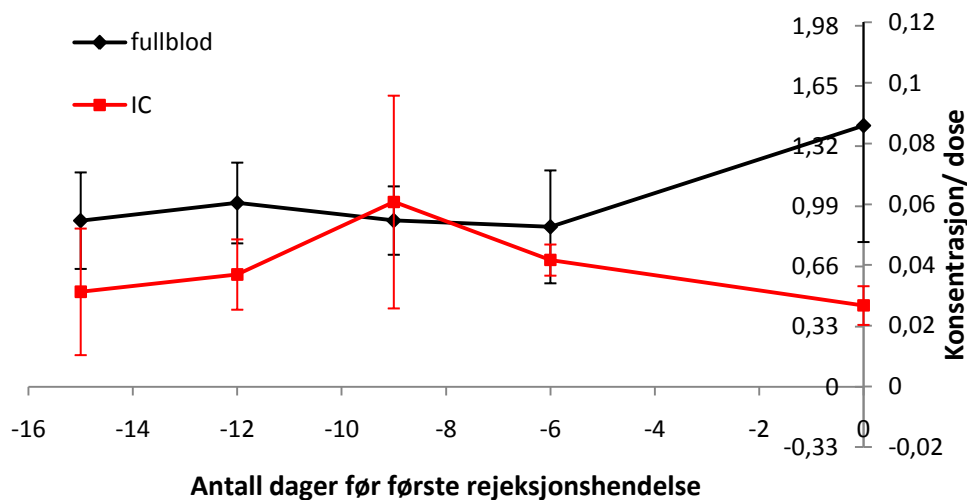
*Figur 3.2 Absoluttkonsentrasjoner av CsA i fullblod og intracellulært i T-lymfocytene som funksjon av antall dager etter hjertetransplantasjon (post HTx-dager). Konsentrasjonene er vist som gjennomsnitt av samtlige pasienter i 3-dagers intervall med standardavvik. Venstre loddrett akse angir fullblodskonsentrasjoner, mens høyre loddrett akse angir intracellulære konsentrasjoner.*

Gjennomsnitt og standardavvik av de målte absoluttkonsentrasjonene av CsA til samtlige pasienter i fullblod og intracellulært i T-lymfocytene, som funksjon av antall dager etter hjertetransplantasjon, er vist i Figur 3.2. Siden pasientene har vært inne til standard oppfølgingsbesøk og avgitt blodprøver ved ulikt antall dager og intervaller etter hjertetransplantasjon, er gjennomsnittet tatt i 3-dagers intervall.



Figur 3.3 Intracellulær/fullblods-konsentrasjoner av CsA som funksjon av antall dager etter hjertetransplantasjon (post HTx-dager). Figuren viser gjennomsnittet i 3-dagers intervall for pasientene uten reaksjon med standardavvik, og pasient 21, 25 og 29 (pasienter med reaksjon). Pilene viser reaksjonstidspunkt for de respektive pasientene. IC= intracellulær.

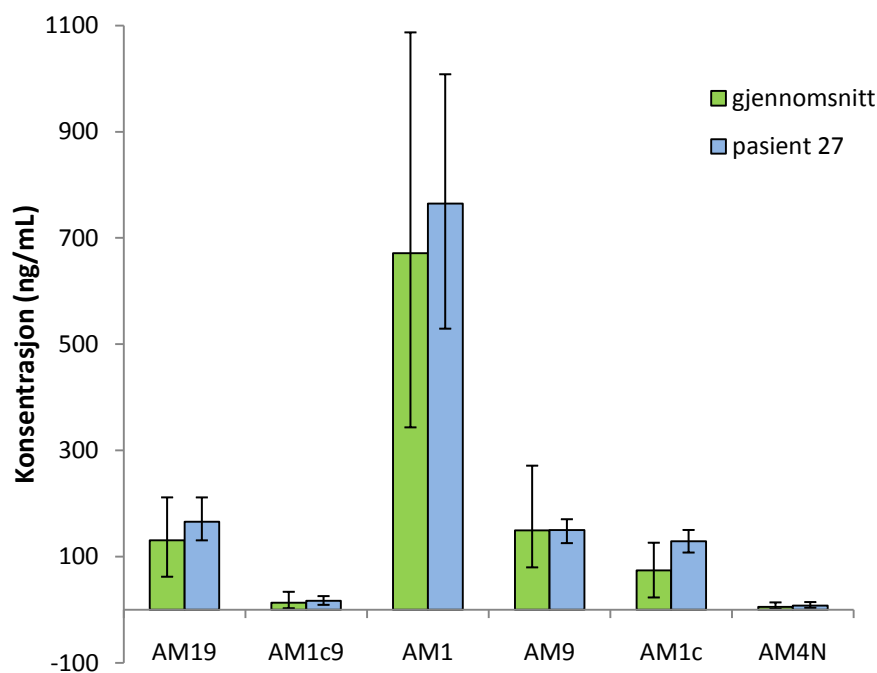
Figur 3.3 belyser andel intracellulær konsentrasjon av CsA i forhold til fullblodskonsentrasjonen av CsA hos de tre pasientene med reaksjon og gjennomsnittlig konsentrasjonsandel hos pasienter uten reaksjon. Pasient 29 har høyere intracellulær konsentrasjonsandel av CsA enn gjennomsnittet av de som ikke har fått reaksjon, dette er i tillegg den pasienten som har opplevd flere reaksjonshendelser. I starten har Pasient 21 en litt høyere intracellulær andel enn gjennomsnittet, men når reaksjonsepisoden inntreffer ligger fordelingen tilnærmet på samme nivå som gjennomsnittet. Dette er ikke tilfellet for pasient 25 som har en intracellulær konsentrasjonsandel som ligger under gjennomsnittet i tilnærmet hele studien.



*Figur 3.4 Dosejustert konsentrasjon av CsA i fullblod og intracellulært for pasienter med reaksjon som funksjon av antall dager før første reaksjonshendelse. De dosejusterte konsentrasjonene er vist i gjennomsnitt i 3-dagers intervall med standardavvik.*

For pasientene med reaksjon er den dosejusterte konsentrasjonen i fullblod og intracellulært gitt som funksjon av antall dager før første reaksjonshendelse vist i Figur 3.4. Konsentrasjonene i figuren er gitt som gjennomsnitt av pasient 21, 25 og 29 i tillegg til standardavvik. Det kunne ikke observeres noen forandring i intracellulærkonsentrasjonen hos disse pasientene i forbindelse med reaksjon.

De gjennomsnittlige absoluttkonsentrasjonene av metabolittene til pasienten med nyresvikt i løpet av studien (pasient 27) og til de resterende pasientene er sammenlignet i Figur 3.5. Ut i fra figuren ble det observert at pasient 27 gjennomsnittlig hadde høyere konsentrasjoner av metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM1c og AM4N enn de øvrige.



Figur 3.5 Gjennomsnittlige absoluttkonsentrasjoner av metabolittene hos pasient 27 og gjennomsnittlig hos de resterende pasientene. Usikkerheten er gitt som maksimum- og minimumsverdier.

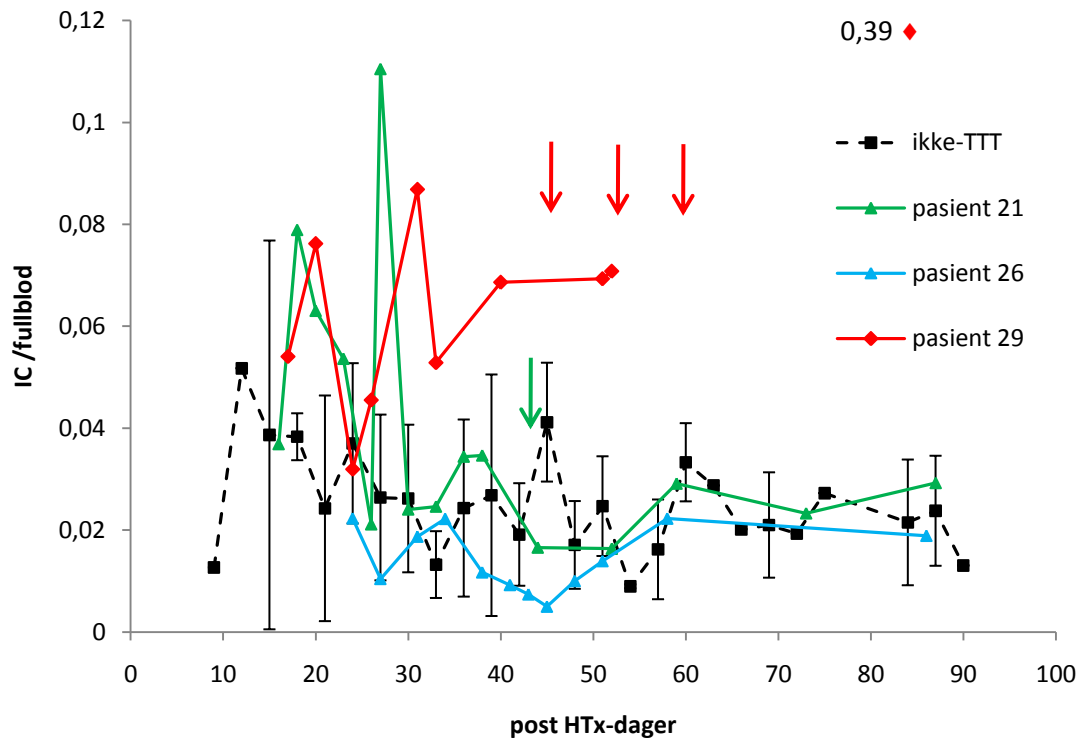
### 3.4 Genotyping av P-gp og CYP3A5

Alle pasientene som deltok i studien er blitt genotypet for 3 ulike P-gp genotyper og 2 CYP3A5 genotyper. En oversikt over de forskjellige genotypene til pasientene kan sees i Tabell 3.3.

Tabell 3.3 Genotyping for P-gp (homozygot haplotype TTT) og CYP3A5 (\*2 og \*3) for alle pasientene som deltok i studien.

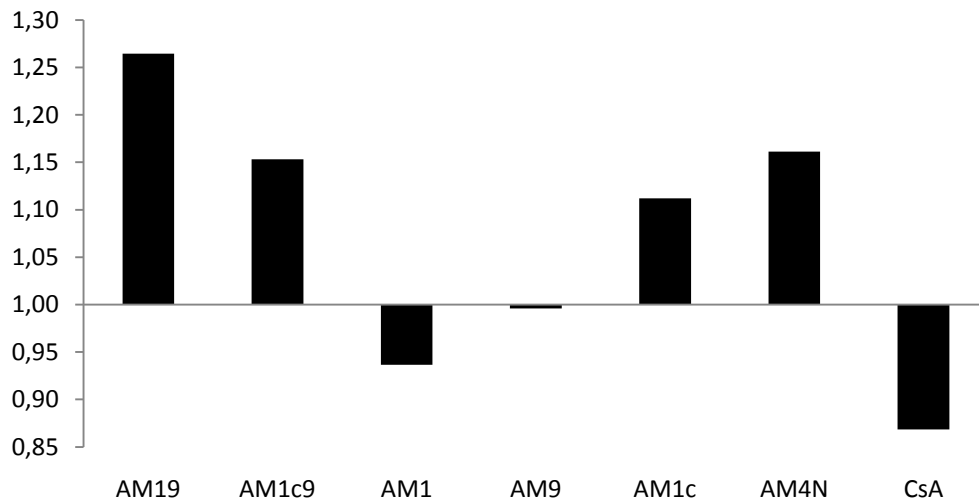
Pasient nr.	P-gp				CYP3A5	
	G2677A/T	C1236T	C3435T	Haplotype TTT	*2	*3
21	T/T	T/T	T/T	ja	*1/*1	*3/*3
22	G/T	C/T	C/T	nei	*1/*1	*1/*3
23	G/T	C/T	C/T	nei	*1/*1	*3/*3
24	G/T	C/T	C/T	nei	*1/*1	*3/*3
25	G/T	C/T	C/T	nei	*1/*1	*3/*3
26	T/T	T/T	T/T	ja	*1/*1	*3/*3
27	G/T	C/T	T/T	nei	*1/*1	*1/*3
28	G/T	C/T	T/T	nei	*1/*1	*3/*3
29	T/T	T/T	T/T	ja	*1/*1	*1/*3
30	G/T	C/T	T/T	nei	*1/*1	*3/*3

Tre pasienter som deltok i studien hadde P-gp haplotype *TTT*, dette var pasient 21, 26 og 29. Ingen av pasientene utviste *CYP3A5*\*2, mens det var sju pasienter som hadde *CYP3A5*\*3/\*3 og tre som hadde *CYP3A5*\*1/\*3. De pasientene som utviste *CYP3A5*\*1/\*3 var henholdsvis pasient 22, 27 og 29.



Figur 3.6 Intracellulær/fullblods-konsentrasjoner av CsA som funksjon av antall dager etter hjertetransplantasjon (post HTx-dager). Figuren viser gjennomsnittet i 3-dagers intervall for pasientene uten P-gp haplotype-*TTT* med standardavvik, og henholdsvis pasient 21, 26 og 29 (pasienter med P-gp haplotype-*TTT*). IC= intracellulær.

Gjennomsnittet av intracellulær/fullblodskonsentrasjoner av alle pasientene som ikke hadde P-gp-haplotype-*TTT*, i forhold til de som hadde haplotypen er vist i Figur 3.6. Pasient 29 og pasient 21 lå over gjennomsnittet i konsentrasjonsnivå, men pasient 21 fikk et senket konsentrasjonsnivå når reaksjonsepisoden inntrådte.



*Figur 3.7 Ratio av gjennomsnittlig konsentrasjon av CsA og metabolitter hos pasienter med CYP3A5 \*1/\*3 i forhold til gjennomsnittlig konsentrasjon av CsA og metabolitter hos pasienter med CYP3A5 \*3/\*3. Konsentrasjonene er dosejusterte.*

I Figur 3.7 er det dosejusterte gjennomsnittet av de forskjellige konsentrasjonene til metabolittene og CsA sammenlignet for de to gruppene av genotyper, *CYP3A5\*1/\*3* og *CYP3A5\*3/\*3*. Pasienter med *CYP3A5\*1/\*3* er vist i forhold til pasienter med *CYP3A5\*3/\*3*. Ut i fra figuren kan det observeres at de pasientene som hadde *CYP3A5\*1/\*3* fikk dannet mer AM19, AM1c9, AM1c, AM4N, like mye AM9 og mindre AM1 og CsA enn de pasientene som hadde *CYP3A5\*3/\*3*.



---

## 4. Diskusjon

### 4.1 Fullblods- og intracellulærkonsentrasjoner i T-lymfocytter

Det har blitt observert at nyretransplanterte pasienter som opplever rejeksjonsepisoder generelt sett har lavere konsentrasjoner av CsA intracellulært i T-lymfocytterne, enn de pasientene som ikke har vært utsatt for en rejeksjon (Falck *et al.* 2008c). I tillegg har Falck vist at konsentrasjonen av CsA reduseres signifikant i T-lymfocytterne 3 dager før en rejeksjonsepisode hos nyretransplanterte pasienter (Falck *et al.* 2008c).

I denne studien ble det observert at en av de hjertetransplanterte pasientene med rejeksjon lå lavere i den intracellulære konsentrasjonen av CsA, enn det gjennomsnittet av pasienter uten rejeksjon gjorde, noe som samsvarer med det Falck har funnet. Derimot hadde de to andre rejeksjonspasientene noe høyere intracellulærkonsentrasjon enn gjennomsnittet. Disse to pasientene hadde i motsetning til den første rejeksjonspasienten P-gp haplotype-*TTT*, som kan føre til en svekket P-gp-aktivitet (Burckart og Liu 2006). Det har tidligere blitt observert at P-gp-aktiviteten øker rett før rejeksjonsepisoden som fører til at den intracellulære CsA-konsentrasjonen synker (Götzl *et al.* 1995), noe som kan sees hos den ene av disse to rejeksjonspasientene. En svekket utpumping av CsA fra T-lymfocytterne, kan derfor være grunnen til den høye intracellulære konsentrasjonen. Blant de nyretransplanterte pasientene til Falck var det kun en pasient med P-gp haplotype-*TTT* (Falck *et al.* 2008c), noe som kan være grunnen til at den gjennomsnittlige intracellulære konsentrasjonen ikke ble nevneverdig påvirket av en eventuelt høyere intracellulær konsentrasjonen hos denne pasienten.

Det kan altså antas at P-gp haplotype-*TTT* kan ha en påvirkning på den intracellulære CsA-konsentrasjonen, og det var i denne studien kun en av rejeksjonspasientene som ikke hadde P-gp haplotype-*TTT*. Det kan dermed ikke konkluderes med at det er noen

---

sammenheng mellom lav intracellulær konsentrasjon av CsA og rejeksjonshendelser, som det har blitt observert for nyretransplanterte.

Det har ikke blitt observert en reduksjon i CsA-konsentrasjon i perioden rett før rejeksjonsepisodene hos noen av rejeksjonspasientene i denne studien. Derfor kan det heller ikke på dette området trekkes noen konklusjon, om at intracellulær konsentrasjonen er en biomarkør hos hjertetransplanterte for rejeksjonshendelse, som det kan se ut til å være hos nyretransplanterte.

Det ble i en tidligere studie observert at pasienter med høye hematokrittverdier hadde redusert intracellulær konsentrasjon av CsA (Barbari *et al.* 2006). Fra Tabell 3.2 kan det observeres at pasientene i denne studien generelt har lave hematokrittverdier. Det kan heller ikke observeres at pasientene med de høyeste verdiene innad i denne studien skiller seg fra de andre når det gjelder intracellulære konsentrasjoner av CsA.

Dersom det hadde vært nok tid tilgjengelig, ville konsentrasjonen av CsA blitt bestemt i hjertebiopsier tatt fra de samme pasientene i studien. Disse konsentrasjonene kunne muligens ha bidratt til å finne en sammenheng eller sammenhenger mellom CsA-konsentrasjon og rejeksjon.

Det intracellulære prøvematerialet manglet 11 pasientprøver i forhold til fullblodsprøvene. De prøvene som var registrert borte var generelt jevnt fordelt mellom pasientene og antall dager etter hjertetransplantasjon, selv om det hos pasient 27, 29 og 30 manglet noen flere prøver enn hos de øvrige (for oversikt over manglende prøver se Appendiks, *Intracellulær- og fullblodskonsentrasjoner*). Mangel på prøver kommer av ulike årsaker under prøvetaking, enten at de ikke er blitt tatt eller har gått til spille på ulike måter underveis. I resultatanalysene ble de savnede prøvene ikke medregnet i gjennomsnittet.

For det intracellulære prøvematerialet ble det lagd en standardkurve med CsA, som gikk fra 0,25 ng/mL til 25 ng/mL. Det var enkelte av pasientprøvene som inneholdt konsentrasjoner som var høyere enn det området standardkurven dekket.

---

Konsentrasjonene av CsA i de pasientprøvene som falt utenfor standardkurven, ble funnet ved å ekstrapolere standardkurven utenfor sitt gjeldende område på grunn av begrenset prøvemateriale (for oversikt over ekstrapolerte konsentrasjoner se Appendiks, *Intracellulær- og fullblodskonsentrasjoner*). Fra tidligere analyser med CsA er det blitt registrert at standardkurven kan få en knekk etter 10 ng/mL, og de konsentrasjonene som er blitt funnet med ekstrapolering utenfor standardkurven må derfor illegges en del usikkerhet. Disse verdiene viste seg å være veldig avvikende fra de øvrige verdiene, og ble derfor valgt å utelate i analysene av pasientdata.

For fullblodsmaterialet var det i enkelte analyser at en eller begge QC- prøver, falt utenfor de forhåndsbestemte grensene. Dette tyder på at analysemetoden hadde en høy variasjon, men ettersom det samtidig med disse prøvene ble opparbeidet og analysert standardkurver ble resultatene fra analysene brukt videre.

De pasientene som blir hjertetransplantert får i tillegg til CsA andre legemidler som skal dempe immunforsvaret, som for eksempel mykofenolatmofetil og steroider. Immunforsvaret til pasienter utviser individuell variasjon og vil derfor kunne respondere ulikt på de immunmodulerende legemidlene. Det er for eksempel individuelt hvilke konsentrasjonsnivåer som trengs for å få en tilfredsstillende effekt, hvilken nedbrytingshastighet som utvises, hvilke metabolitter som dannes og mengdene som dannes av de ulike metabolittene. Den individuelle variasjonen kan i tillegg forandre seg over tid og forandre seg ved utvikling eller endring av sykdom. Den individuelle variasjonen til hver enkelt pasient, gjør at immunresponsen vil være individuell og det kan være en medvirkende faktor til at noen pasienter opplever en rejeksjonsepisode ved en viss konsentrasjon av CsA, mens andre ikke gjør det. Den intracellulære konsentrasjonen av CsA kan derfor ikke alene forklare en rejeksjonsepisode av et transplantat.

---

## 4.2 Metabolitter

Det har i tidligere studier blitt observert at de sekundære metabolittene til CsA kan assosieres med nedsatt nyrefunksjon, hvor AM19 har blitt foreslått brukt som biomarkør for nedsatt nyrefunksjon i nyretransplanterte pasienter (Kempkes-Koch *et al.* 2001). Det har videre blitt vist at personer med *CYP3A5\*1* vil få økt dannelse av AM9, og de sekundære metabolittene AM19 og AM1c9, enn personer som ikke uttrykker CYP3A5 (Dai *et al.* 2004). Fra Figur 3.7 observeres det at pasientene med genotype *CYP3A5\*1/\*3* har høyere nivå av AM19, AM1c9, AM1c og AM4N i forhold til pasienter med genotype *CYP3A5\*3/\*3*. Dette samsvarer med hva tidligere studier har vist. AM9 er derimot ikke høyere, slik den teoretisk sett burde, noe som kan skyldes at den metaboliseres videre via andre metabolismeveier enn de vist i Figur 1.4. Det observeres også at AM19 er metabolitten som har størst relativ økning. I pasientmateriale er det en pasient med registrert nyresvikt i løpet av studien, hvor denne pasienten er en av de med *CYP3A5\*1/\*3*. Siden denne pasienten også har høyere mengde AM19 samsvarer dette med at AM19 kan brukes som biomarkør for nyresvikt, som tidligere foreslått.

Det fantes ikke standarder for metabolittene AM19, AM1c9 og AM4N, derfor ble det brukt ekstrapolering for å finne konsentrasjonen av disse metabolittene i fullblodsprøvene. Dette er ikke en helt optimal måte å finne de respektive konsentrasjonene på, men det var den beste måten det kunne bli gjort på, med de tilgjengelige materialer og data på det tidspunktet.

I utgangspunktet ville det muligens være mest korrekt å anvende de faktiske faktorverdiene i stedet for å bruke et gjennomsnitt. Ettersom disse verdiene sannsynligvis uansett ville variere noe, med tanke på den omfattende prøveopparbeidelsen og de analytiske analysene, er det blitt antatt at det er tilstrekkelig å benytte en gjennomsnittsfaktor. Dersom det kunne sees at faktoren endret seg etter et spesielt mønster, kunne det antas at bruk av gjennomsnittsfaktoren

---

ville gi et uriktig bilde, men siden det ikke kunne sees noe spesielt mønster i faktorene ble det antatt at variasjonen var tilfeldig.

---

## 5. Konklusjon

Det har ikke blitt funnet noen biomarkør for å kunne forutse rejeksjon hos hjertetransplanterte, men det kan ikke avskrives å være en sammenheng mellom lav intracellulær konsentrasjon av CsA i T-lymfocytter og rejeksjonshendelser, som det tidligere er observert for nyretransplanterte. Det ble videre funnet at pasientene som uttrykker funksjonelt CYP3A5 hadde høyere dannelselse av AM19, AM1c9, AM1c og AM4N. Pasienten som utviklet nyresvikt hadde også høyest nivå av AM19, som kan korrelere med at AM19 kan brukes som biomarkør for nyresvikt.

---

## 6. Fremtidsutsikter

Det er blitt tatt hjertebiopsier fra pasientene i denne studien, som det i utgangspunktet skulle blitt bestemt CsA-konsentrasjonen i. Det ble ikke tilstrekkelig med tid for å få dette utført, derfor bør disse konsentrasjonsbestemmelsene gjennomføres. Ved å benytte resultatene fra denne masteroppgaven i tolkningen av CsA-konsentrasjonene i hjertebiopsiene, kan det muligens avsløres sammenhenger som kan forutse rejeksjoner.

Blant rejeksjonspasientene i denne studien var det 2 av 3 som hadde P-gp- haplotype *TTT*, det kunne derfor vært av interesse å bestemme konsentrasjonen av CsA intracellullært i T-lymfocytene hos flere hjertetransplanterte med rejeksjon uten denne haplotypen. Dette for å kunne bestemme en intracellulær konsentrasjon av CsA, som sannsynligvis ikke blir påvirket av P-gp i like stor grad som i denne studien.

Ettersom det tidligere har blitt observert en reduksjon i den intracellulære konsentrasjonen av CsA i T-lymfocytter like før rejeksjon hos nyretransplanterte, er det grunn til å undersøke dette i en større populasjon hjertetransplanterte selv om dette ikke har blitt observert i denne pilotstudien.

---

## Referanseliste

- Akhlaghi, F., McLachlan, A. J., Keogh, A. M. og Brown, K. F. (1997). "Effect of simvastatin on cyclosporine unbound fraction and apparent blood clearance in heart transplant recipients." Br J Clin Pharmacol **44**(6): 537-542.
- Ambudkar, S. V., Kim, I. W. og Sauna, Z. E. (2006). "The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)." Eur J Pharm Sci **27**(5): 392-400.
- Barbari, A. G., Masri, M. A., Stephan, A. G., El Ghoul, B., Rizk, S., Mourad, N., Kamel, G. S., Kilani, H. E. og Karam, A. S. (2006). "Cyclosporine lymphocyte maximum level monitoring in de novo kidney transplant patients: a prospective study." Exp Clin Transplant **4**(1): 400-405.
- Barnard, C. N. (1967). "The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town." S Afr Med J **41**(48): 1271-1274.
- Bennett, W. M., DeMattos, A., Meyer, M. M., Andoh, T. og Barry, J. M. (1996). "Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy." Kidney Int **50**(4): 1089-1100.
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U. og Stähelin, H. (1976). "Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent." Agents Actions **6**(4): 468-475.
- Burckart, G. J. og Liu, X. I. (2006). "Pharmacogenetics in transplant patients: can it predict pharmacokinetics and pharmacodynamics?" Ther Drug Monit **28**(1): 23-30.
- Cantarovich, M., Giannetti, N., Cecere, R. og Besner, J. G. (2003). "Time point predictors of cyclosporine microemulsion and of mycophenolic acid area under the curve (0-12 hr) in long-term heart-transplant patients." American transplant congress 2003. Am J Transplant. **3**(s5): 151-254.
- Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Brinkmann, U. og Roots, I. (2001). "Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 169-174.
- Christians, U. og Sewing, K. F. (1993). "Cyclosporin metabolism in transplant patients." Pharmacol Ther **57**(2-3): 291-345.
- Christians, U. og Sewing, K. F. (1995). "Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity." Clin Biochem **28**(6): 547-559.
- Group CMTS (1983). "A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation." N Engl J Med **309**(14): 809-815.
- Collins, D. P. (2000). "Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems." J Immunol Methods **243**(1-2): 125-145.
- Copeland, K. R., Thliveris, J. A. og Yatscoff, R. W. (1990). "Toxicity of cyclosporine metabolites." Ther Drug Monit **12**(6): 525-532.



- 
- Dai, Y., Iwanaga, K., Lin, Y. S., Hebert, M. F., Davis, C. L., Huang, W., Kharasch, E. D. og Thummel, K. E. (2004). "In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5." Biochem Pharmacol **68**(9): 1889-1902.
- Delgado, D. H., Rao, V., Cusimano, R. J., Feindel, C. M., Grady, C. O., Hamel, M. J., Young, E., McCurdy, C. og Ross, H. J. (2002). "Monitoring of cyclosporine 2-hr post-dose and trough levels in heart transplantation." J Heart Lung Transplant **21**(1): 102-103.
- Drewe, J., Beglinger, C. og Kissel, T. (1992). "The absorption site of cyclosporin in the human gastrointestinal tract." Br J Clin Pharmacol **33**(1): 39-43.
- Dunn, C. J., Wagstaff, A. J., Perry, C. M., Plosker, G. L. og Goa, K. L. (2001). "Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation." Drugs **61**(13): 1957-2016.
- Elliott, J. F., Lin, Y., Mizel, S. B., Bleackley, R. C., Harnish, D. G. og Paetkau, V. (1984). "Induction of Interleukin 2 Messenger RNA Inhibited by Cyclosporin A." Science **226**(4681): 1439-1441.
- Fahr, A. (1993). "Cyclosporin clinical pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet **24**(6): 472-495.
- Falck, P. (2008). "Whole blood and intracellular pharmacokinetics of cyclosporine A in renal transplant recipients." Doktorgradsavhandling. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- Falck, P., Fiane, AE., Geiran, OR., Åsberg, A. (2009). "Individual Differences in Cyclosporine A Pharmacokinetics and Its Association with Acute Renal Function Following Heart Transplantation." The Open Transplantation Journal **3**: 9-13.
- Falck, P., Guldseth, H., Åsberg, A., Midtvedt, K. og Reubsæet, J. L. E. (2007). "Determination of cyclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **852**(1-2): 345-352.
- Falck, P., Vethe, N. T., Åsberg, A., Midtvedt, K., Bergan, S., Reubsæet, J. L. og Holdaas, H. (2008a). "Cinacalcet's effect on the pharmacokinetics of tacrolimus, cyclosporine and mycophenolate in renal transplant recipients." Nephrol Dial Transplant **23**(3): 1048-1053.
- Falck, P., Åsberg, A., Byberg, K. T., Bremer, S., Bergan, S., Reubsæet, J. L. og Midtvedt, K. (2008b). "Reduced elimination of cyclosporine A in elderly (>65 years) kidney transplant recipients." Transplantation **86**(10): 1379-1383.
- Falck, P., Åsberg, A., Guldseth, H., Bremer, S., Akhlaghi, F., Reubsæet, J. L., Pfeffer, P., Hartmann, A. og Midtvedt, K. (2008c). "Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine precedes acute rejection in kidney transplant recipients." Transplantation **85**(2): 179-184.
- Frøland, S. S. (2007). "Immunsykdommer og transplantasjoner." I Vilberg, A. (red.). Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell, Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, Oslo, s. 480.

- 
- Frøysaker, T., Lindberg, H., Geiran, O., Ovrum, E., Aune, H., Am-Holen, E., Simonsen, S. og Forfang, K. (1984). "The 1st heart transplant in Norway." Tidsskr Nor Lægeforen **104**(14): 946-948.
- Guldseth, H. (2005). "Konsentrasjonsbestemmelse av ciklosporin A og metabolitter i T-lymfocytter fra nyretransplanterte pasienter." Hovedfagsoppgave i farmasi. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- Götzl, M., Wallner, J., Gsur, A., Zöchbauer, S., Kovarik, J., Balcke, P. og Pirker, R. (1995). "MDR1 gene expression in lymphocytes of patients with renal transplants." Nephron **69**(3): 277-280.
- Halloran, P. F. (2001). "Mechanism of action of the calcineurin inhibitors." Transplant Proc **33**(7-8): 3067-3069.
- Halloran, P. F., Helms, L. M., Kung, L. og Noujaim, J. (1999). "The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo." Transplantation **68**(9): 1356-1361.
- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. og Speicher, D. W. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." Science **226**(4674): 544-547.
- Hansen, J. M., Fogh-Andersen, N., Christensen, N. J. og Strandgaard, S. (1997). "Cyclosporine-induced hypertension and decline in renal function in healthy volunteers." J Hypertens **15**(3): 319-326.
- Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J. og Stablein, D. (2000). "Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996." N Engl J Med **342**(9): 605-612.
- Jensen, P., Hansen, S., Møller, B., Leivestad, T., Pfeffer, P., Geiran, O., Fauchald, P. og Simonsen, S. (1999). "Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens." J Am Acad Dermatol **40**(2 Pt 1): 177-186.
- Johnson, H. J. (2006). "Transplantation." I Helms, R. A., Quan, D. J., Herfindal, E. T. og Gourley, D. R. (red.). Textbook of therapeutics: drug and disease management. 8.opplag, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, s. 685-688.
- Kahan, B. D., Welsh, M., Schoenberg, L., Rutzky, L. P., Katz, S. M., Urbauer, D. L. og Van Buren, C. T. (1996). "Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection." Transplantation **62**(5): 599-606.
- Kempkes-Koch, M., Fobker, M., Erren, M., August, C., Gerhardt, U., Suwelack, B. og Hohage, H. (2001). "Cyclosporine A metabolite AM19 as a potential biomarker in urine for CSA nephropathy." Transplant Proc **33**(3): 2167-2169.
- Keown, P. A., Stiller, C. R., Ulan, R. A., Sinclair, N. R., Wall, W. J., Carruthers, G. og Howson, W. (1981). "Immunological and pharmacological monitoring in the clinical use of cyclosporin A." Lancet **1**(8222): 686-689.
- Kløy, N. E., Levorstad, K., Simonsen, S. og Geiran, O. (1998). "Coronary arteriopathy after heart transplantation." Acta Radiol **39**(6): 656-662.
- Krensky, A. M., Vincenti, F. og Bennett, W. M. (2006). "Immunosuppressants, tolerogens, and immunostimulants." I Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton,

- 
- L. L., Lazo, J. S. og Parker, K. L. (red.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11. opplag, McGraw-Hill, New York, s. 1408-1412.
- Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., Watkins, P. B., Daly, A., Wrighton, S. A., Hall, S. D., Maurel, P., Relling, M., Brimer, C., Yasuda, K., Venkataramanan, R., Strom, S., Thummel, K., Boguski, M. S. og Schuetz, E. (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression." Nat Genet **27**(4): 383-391.
- Kuster, G. M., Drexel, H., Bleisch, J. A., Rentsch, K., Pei, P., Binswanger, U. og Amann, F. W. (1994). "Relation of cyclosporine blood levels to adverse effects on lipoproteins." Transplantation **57**(10): 1479-1483.
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. og Schreiber, S. L. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." Cell **66**(4): 807-815.
- Mahalati, K., Belitsky, P., Sketris, I., West, K. og Panek, R. (1999). "Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation." Transplantation **68**(1): 55-62.
- Molden, E. (2004). "P-glycoprotein--a pump of significance for drug response." Tidsskr Nor Lægeforen **124**(22): 2921-2923.
- Mueller, E. A., Kallay, Z., Kovarik, J. M., Richard, F., Wiesinger, O., Schmidt, K. og Scheele, J. (1995). "Bile-independent absorption of cyclosporine from a microemulsion formulation in liver transplant patients." Transplantation **60**(5): 515-517.
- Myers, B. D. og Newton, L. (1991). "Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury." J Am Soc Nephrol **2**(2 Suppl 1): S45-52.
- Noble, S. og Markham, A. (1995). "Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral)." Drugs **50**(5): 924-941.
- Olyaei, A. J., de Mattos, A. M. og Bennett, W. M. (2001). "Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies." Curr Opin Crit Care **7**(6): 384-389.
- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. og Komano, T. (1993). "Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506." J Biol Chem **268**(9): 6077-6080.
- Simonsen, S., Andreassen, A. K., Gullestad, L., Leivestad, T., Fiane, A. E. og Geiran, O. R. (2007). "Survival after heart transplantation in Norway." Tidsskr Nor Lægeforen **127**(7): 865-868.
- Simonsen, S. og Geiran, O. R. (2004). "Heart transplantation." Tidsskr Nor Lægeforen **124**(8): 1116-1118.
- Solari, S. G., Goldberg, L. R., DeNofrio, D. og Shaw, L. M. (2005). "Cyclosporine monitoring with 2-hour postdose levels in heart transplant recipients." Ther Drug Monit **27**(4): 417-421.

---

SPC. (2010). Sandimmun Neoral.

Taylor, D. O., Edwards, L. B., Boucek, M. M., Trulock, E. P., Deng, M. C., Keck, B. M. og Hertz, M. I. (2005). "Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult heart transplant report--2005." J Heart Lung Transplant **24**(8): 945-955.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. og Willingham, M. C. (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-7738.

van Schaik, R. H., van der Heiden, I. P., van den Anker, J. N. og Lindemans, J. (2002). "CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians." Clin Chem **48**(10): 1668-1671.

---

## Appendiks

### Reagenser

- Acetonitril: Acetonitrile isocratic grade for liquid chromatography, Merck, Darmstat, Tyskland
- AM1, AM9 og AM1c: Novartis, Basel, Sveits
- Ammoniakk-løsning 25%: Ammonia solution 25% for analysis, Merck, Darmstat, Tyskland
- Ciklosporin A: Cyclosporin A, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
- Ciklosporin A: Novartis, Basel, Sveits
- Ciklosporin C: Novartis, Basel, Sveits
- Deionisert vann: Deionisert vann, fremstilt ved hjelp av Easypure UV compact ultrapure water system, Barnstead, USA
- Deionisert vann: Deionisert vann, fremstilt ved hjelp av Purelab Maxima HPLC, Vivendi Water Systems, Buckinghamshire, Storbritannia
- Destillert vann: Destillert vann, fremstilt ved hjelp av Aquatron A4S, Bibby Science Products SA, Frankrike
- Fosfatbufret saltvann: 10X PBS Wash Buffer, BioE Inc., St. Paul, MN, USA
- Iseddik: Acetic acid (glacial) 100% anhydrous for analysis, Merck, Darmstadt, Tyskland
- Maursyre: Formic acid 98-100% for analysis, Merck, Darmstadt, Tyskland
- Metanol: Methanol for liquid chromatography, Merck, Darmstadt, Tyskland
- Prepacyte: PrepaCyte<sup>®</sup>-TC Cell Isolation Reagent, BioE Inc., St. Paul, MN, USA
- Vitalyse: VitaLyse<sup>™</sup>: BioE Inc., St. Paul, MN, USA

---

# Utstyr

## Generelt utstyr

- Fast-fase-kolonne: Oasis<sup>®</sup> HLB 1cc (30 mg) Extraction Cartridge, Waters Corporation, Irland
- Heparinrør: BD Vacutainer<sup>®</sup> 6 ml, Plymouth, Storbritannia
- Heparinrør: Venosafe<sup>™</sup> 9 ml Sodium Heparin, Terumo<sup>®</sup>, Leuven, Belgia
- pH-meter med bufferløsninger: Φ50 pH Meter, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA
- Sentrifuge: Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific, Langenselbold, Sveits
- Sentrifuge: Universal 32 R, Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
- UV-bad: Bandelin Sonorex 100, Bandelin Electronic, Berlin, Tyskland
- Vakuum- sentrifuge- inndampningssystem:
  - SPD121P- Speedvac<sup>®</sup> Concentrator, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA
  - RVT4104 Refrigerated Vapor Trap, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA
  - OFP400 Oil- Free Vacuum Pump, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA
- Vandeionisering: Easypure UV compact ultrapure water system, Barnstead, USA
- Vandeionisering: Purelab Maxima HPLC, Vivendi Water Systems, Buckinghamshire, Storbritannia
- Vandestillering: Aquatron A4S, Bibby Science Products SA, Frankrike
- Vippe: Vari-Mix, Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA
- Whirlmikser: IKA<sup>®</sup> MS 3 basic, IKA<sup>®</sup> Works Inc., Wilmington, USA
- Whirlmikser: Whirlmixer TM, Fisons Scientific Apparatus, Leicestershire, England

---

**LC-MS/MS- apparatur:**

- Pumpe: LPG- 3000; LPG-3300, Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
- Autosampler: Ultimate 3000 Autosampler; WPS-3000TSL Analytical, Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
- Forkolonne: BDS- Hypersil- C8, 10 x 2 mm, 5 µm, Thermo Electron Corporation, CT, USA
- Kolonne: BetaBasic-8, 30 x 2,1 mm, 3 µm, Thermo Electron Corporation, CT, USA
- Kolonneovn: CTO-20AC Prominence Column oven, Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA
- MS: Finnigan LCQ<sup>TM</sup> DUO, ThermoQuest Corporation, San Jose, CA, USA

**Annet utstyr:**

- Standard laboratorieutstyr

---

## Løsninger

- Ammoniumformatbuffer ( $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$ ), 20 mM, pH 3,6: En liter ionebyttet vann ble tilsatt 1,5 mL 25 % ammoniakkløsning. Maursyre ble dråpevis tilsatt blandingen til pH 3,6. Oppbevaring ved romtemperatur.
- Mobilfase A: ACN/20 mM  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$  pH 3,6 (20:80 v/v): 100 mL ACN og 400 mL 20 mM  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$  ble blandet. Oppbevares ved romtemperatur.
- Mobilfase B: ACN/20 mM  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$  (80:20 v/v): 400 mL ACN og 100 mL  $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$  ble blandet. Oppbevares ved romtemperatur.
- LC-MS/MS- vaskeløsning: Metanol/MS- vann/iseddik (50:50:1 v/v): 100 mL metanol og 100 mL MS- vann ble tilsatt 2 mL iseddik. Oppbevaring ved romtemperatur.
- Stamlløsning med CsA og metabolittene AM1, AM9 og AM1c: Stamlløsning med CsA og metabolittene AM1, AM9 og AM1c på 5  $\mu\text{g/mL}$  i ACN/MeOH/deionisert  $\text{H}_2\text{O}$  (20%/20%/60% v/v) ble fortynnet til 1  $\mu\text{g/mL}$ , 100 ng/mL og 10 ng/mL. Oppbevaring i fryser ved  $-20^\circ\text{C}$ .
- Stamlløsning med CsA: Stamlløsning med CsA på 100 $\mu\text{g/mL}$  i ACN/MeOH/deionisert  $\text{H}_2\text{O}$  (20%/20%/60% v/v) ble fortynnet til 1  $\mu\text{g/mL}$ , 100 ng/mL, 10 ng/mL og 1 ng/mL. Oppbevaring i fryser ved  $-20^\circ\text{C}$ .
- Stamlløsning med CsC: Stamlløsning på 0,5  $\mu\text{g/mL}$  i ACN/MeOH/deionisert  $\text{H}_2\text{O}$  (20%/20%/60% v/v). Oppbevaring i fryser ved  $-20^\circ\text{C}$ .
- PBS: PBS/deionisert vann (1:10 v/v): 20 mL PBS ble blandet med 180 mL deionisert vann. Oppbevares i kjøleskap ved  $-4^\circ\text{C}$ .
- Vitalyse: Vitalyse/deionisert vann (1:10 v/v): 10 mL vitalyse ble blandet med 90 mL deionisert vann. Oppbevares i kjøleskap ved  $-4^\circ\text{C}$ .



---

## LC-MS/MS- innstillinger

### Innstillinger for MS- Finnigan LCQ™ DUO

Innstillinger for MS- Finnigan LCQ™ DUO som ble benyttet ved analyse av CsA og metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM9, AM1c og AM4N, kan sees i Tabell 0.1.

*Tabell 0.1 MS- Finnigan LCQ™ DUO- innstillinger for analysemetoden.  
APCI=atmospheric pressure chemical ionisation, arb= arbitrary software unit.*

---

#### APCI - source

Source Heater Temp (°C)	450
Capillary Temp (°C)	150
Capillary Voltage (V)	29
Discharge Current (µA)	5
Sheath gas flow rate (arb)	80
Aux gas flow rate (arb)	5
Tube Lens Offset (V)	5

---

#### Ion Optics

Multipole 1 Offset (V):	-3,75
Lens Voltage (V):	-22
Multipole 2 offset (V):	-5
Multipole RF Amp (Vp-p):	400

---

#### Ion Detection System

Dynode Voltage (kV):	0,03
Multiplier Voltage (V):	-1200

## MS/MS- konfigurering for analyttene

MS/MS- konfigureringen for CsC, CsA og metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM9, AM1c og AM4N kan sees i Tabell 0.2. Tabellen inneholder en oversikt over segmentene, fragmenteringsovergange i MRM og kollisjonsenergiene.

*Tabell 0.2 En oversikt over MS/MS- konfigureringen til CsC, CsA og metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM9, AM1c og AM4N. Hver analytt er vist i forhold til hvilket segment de tilhører, med sine fragmenteringsoverganger i MRM og de enkelte kollisjonsenergiene. CsA= ciklosporin A, CsC= ciklosporin C.*

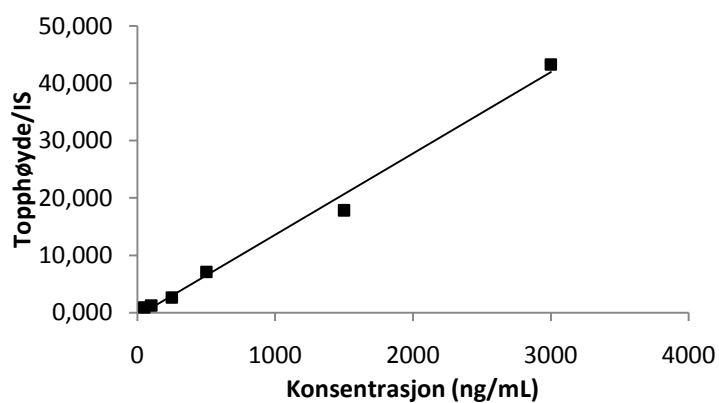
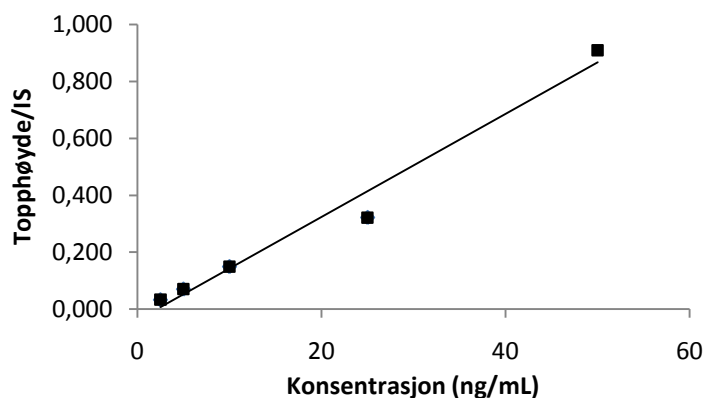
Segment	Tid (min)	Analytt	modermasse [m/z]	kollisjonsenergi (%)	datterion [m/z]
1	0 - 10	AM19	1235,8	28	993,90- 996,90
					1131,10-1134,10
					1216,00-1219,00
		AM1c9	1235,8	28	1089,10-1092,10 1190,20-1193,20
2	10 - 17	AM1 og AM9	1219,7	30	1074,20-1077,20
					1115,20-1118,20
					1200,20-1203,20
		AM1c	1219,7	34	1105,20-1108,20 1187,20-1190,20
3	17 - 28,3	AM4N	1189,7	28	1076,10-1079,10
					1170,20-1173,20
		CsC	1219,7	32	1087,20-1090,20
					1200,20-1203,20
		CsA	1203,7	28	1069,50-1072,50 1183,20-1186,20

# Standardkurver for CsA og metabolittene i fullblod

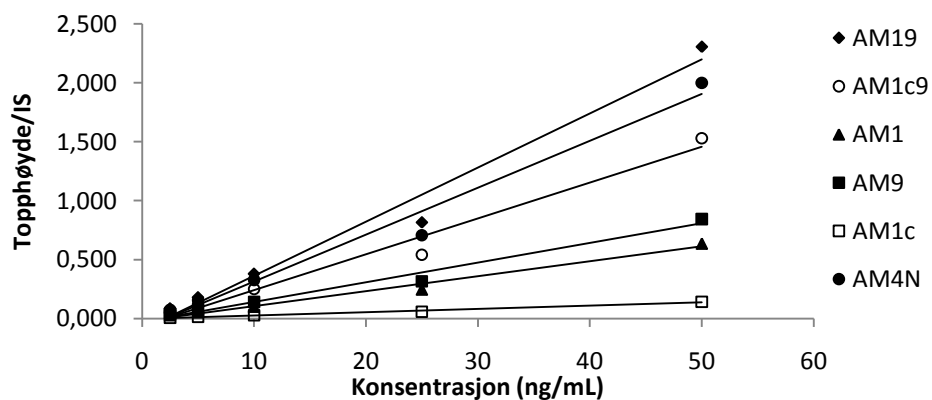
## Gruppe 1

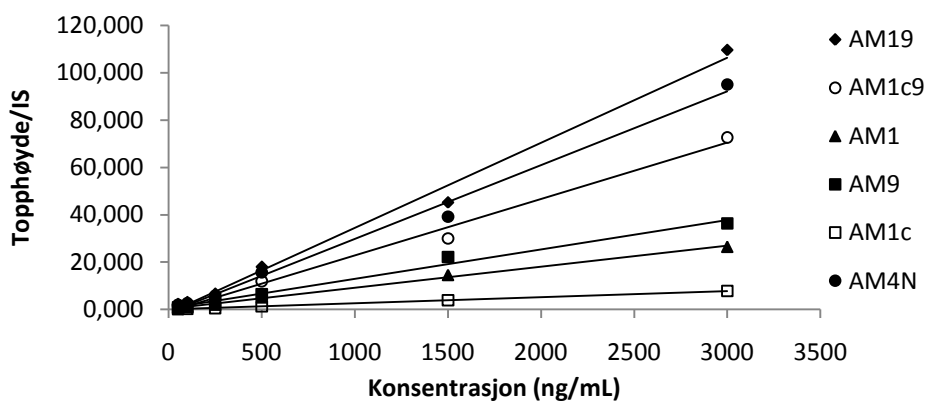
Standardkurvene gjelder for pasient 21 ved blodprøver tatt i perioden 16-52 dager etter hjertetransplantasjon.

a)



b)





c)

Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
CsA	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0181x - 0,0384$	0,9778
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0142x - 0,6027$	0,9919
AM19	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0459x - 0,0973$	0,9778
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0359x - 1,5276$	0,9919
AM1c9	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0304x - 0,0645$	0,9778
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0238x - 1,0125$	0,9919
AM1	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0127x - 0,0227$	0,9863
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0089x + 0,2941$	0,9972
AM9	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0167x - 0,027$	0,9823
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0124x + 0,5459$	0,9889
AM1c	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0028x - 0,0013$	0,9892
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0026x + 0,0127$	0,9996
AM4N	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0398x - 0,0843$	0,9778
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0312x - 1,324$	0,9919

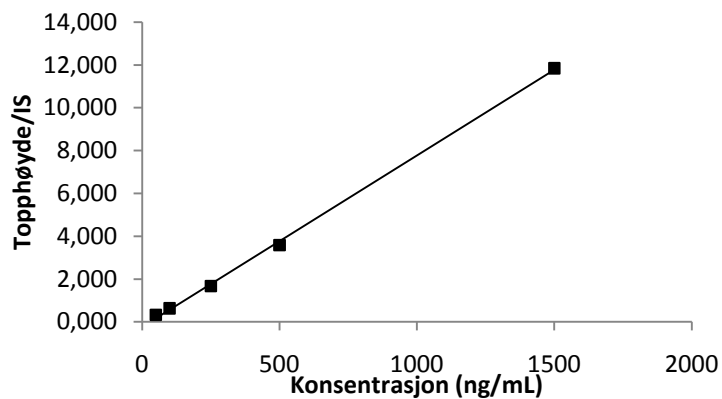
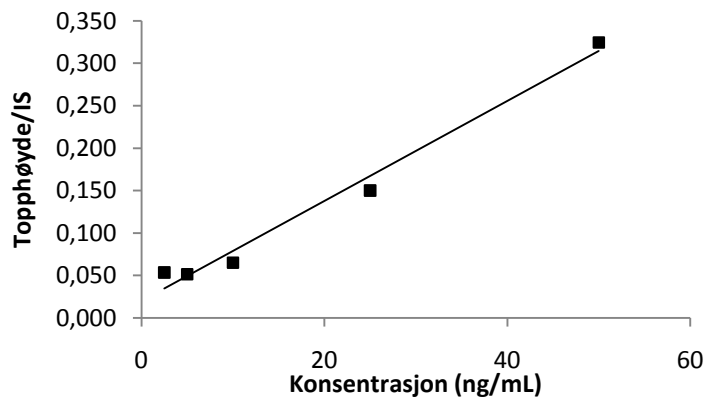
Figur 0.1 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). R<sup>2</sup> = regresjonskoeffisient.

---

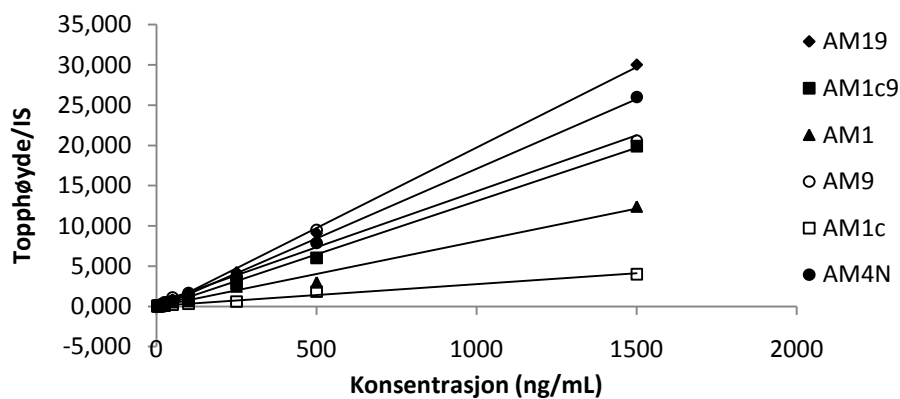
## Gruppe 2

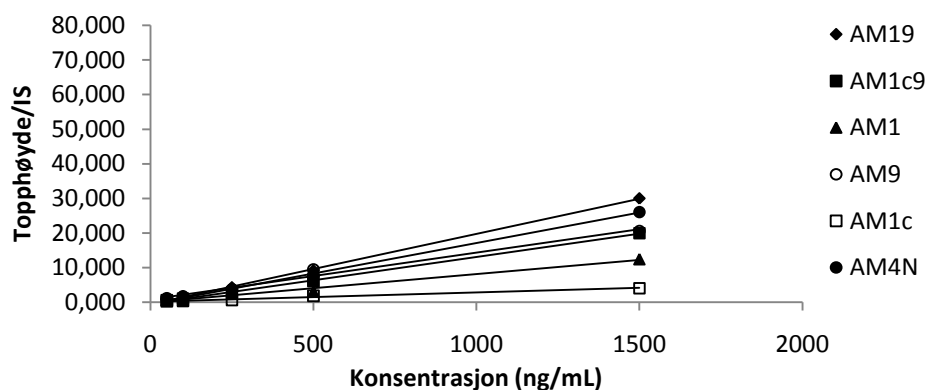
Standardkurvene gjelder for pasient 21 ved blodprøver tatt i perioden 59-87 dager etter hjertetransplantasjon, for pasient 22 ved samtlige blodprøver og for pasient 23 i perioden 25-53 dager etter hjertetransplantasjon.

a)



b)





c)

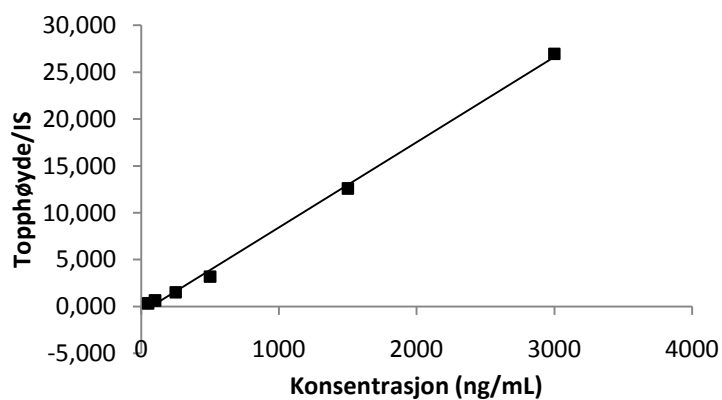
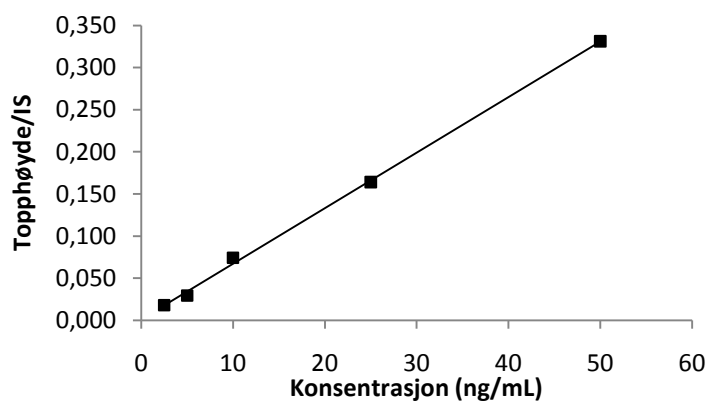
Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
<b>CsA</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0059x + 0,02$	0,9826
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,008x - 0,2315$	0,9992
<b>AM19</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0116x + 0,0797$	0,9564
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0203x - 0,5866$	0,9992
<b>AM1c9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0077x + 0,0528$	0,9564
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0134x - 0,3888$	0,9992
<b>AM1</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0088x + 0,0205$	0,9613
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0082x - 0,0987$	0,9854
<b>AM9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0188x + 0,0221$	0,9681
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0135x + 0,7974$	0,9824
<b>AM1c</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0035x + 0,0032$	0,965
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0027x + 0,1192$	0,9806
<b>AM4N</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,01x + 0,0691$	0,9564
	50-1500 ng/mL*	$y = 0,0176x - 0,5084$	0,9992

Figur 0.2 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-1500 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-1500 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). \*=høyeste konsentrasjon i øverste konsentrasjonsintervall ble brukt som test for LC-MS/MS-apparatur. R<sup>2</sup>= regresjonskoeffisient.

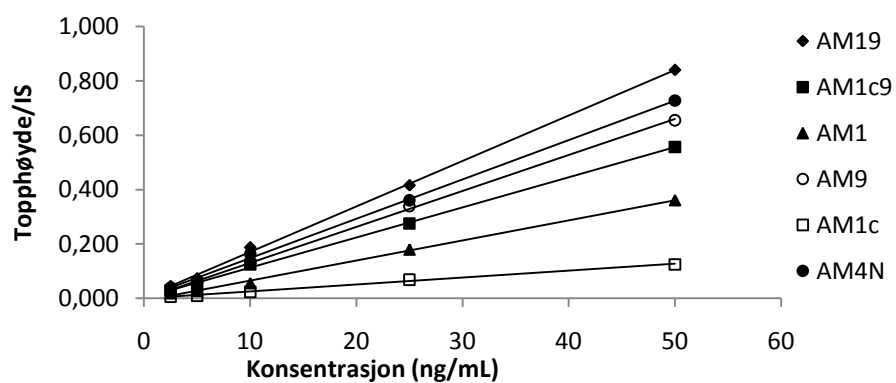
### Gruppe 3

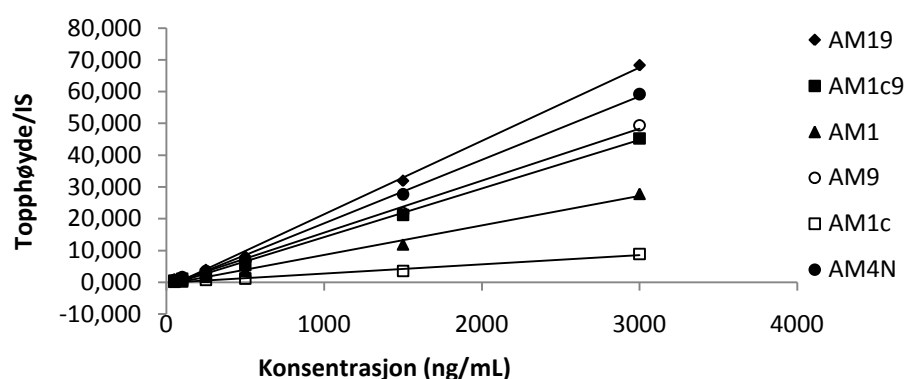
Standardkurvene gjelder for pasient 23 ved blodprøver tatt i perioden 57-88 dager etter hjertetransplantasjon, og for pasient 24 ved 14-70 dager etter hjertetransplantasjon.

a)



b)





c)

Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
<b>CsA</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0066x + 0,0013$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0091x - 0,6522$	0,9978
<b>AM19</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0167x + 0,0032$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0231x - 1,6529$	0,9978
<b>AM1c9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0111x + 0,0022$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0153x - 1,0956$	0,9978
<b>AM1</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0074x - 0,0081$	0,9979
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0093x - 0,6321$	0,9947
<b>AM9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0132x - 0,0024$	0,9995
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0164x - 0,783$	0,9963
<b>AM1c</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0026x - 0,0006$	0,996
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0029x - 0,1513$	0,9903
<b>AM4N</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0145x + 0,0028$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,02x - 1,4326$	0,9978

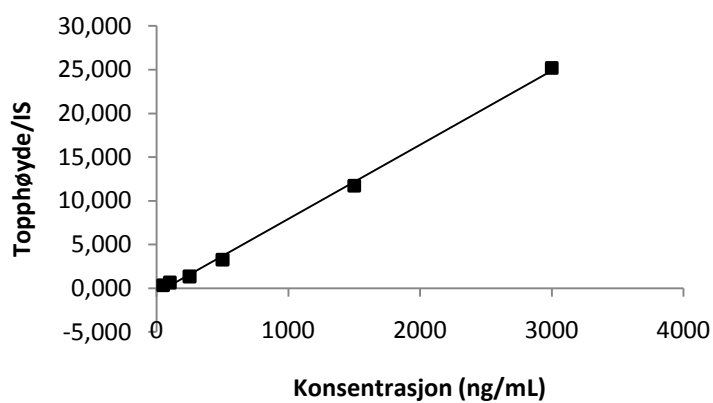
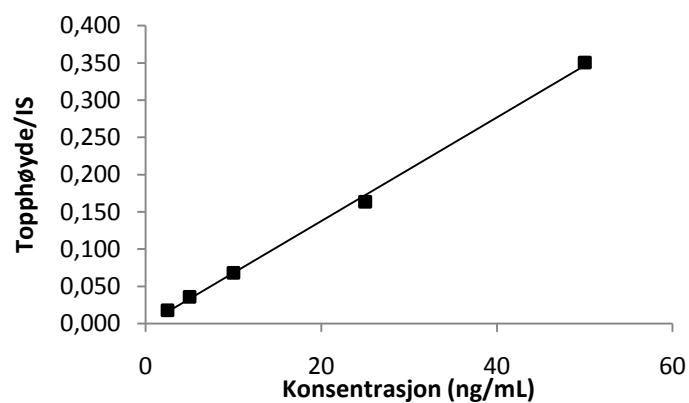
Figur 0.3 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). R<sup>2</sup> = regresjonskoeffisient.



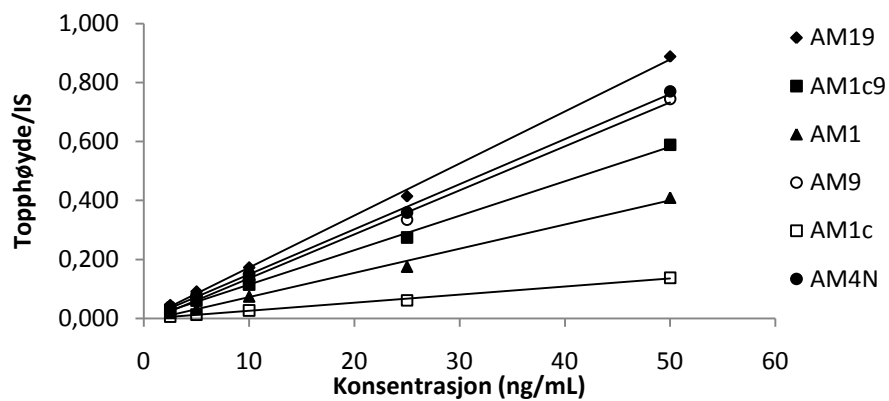
## Gruppe 4

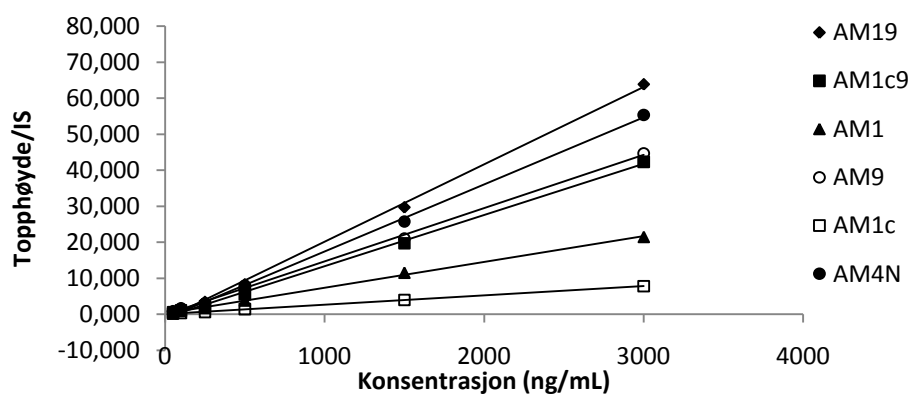
Standardkurvene gjelder for pasient 24 ved blodprøve tatt 84 etter hjertetransplantasjon, for pasient 25 ved samtlige blodprøver og for pasient 26 i perioden 24-38 dager etter hjertetransplantasjon.

a)



b)





c)

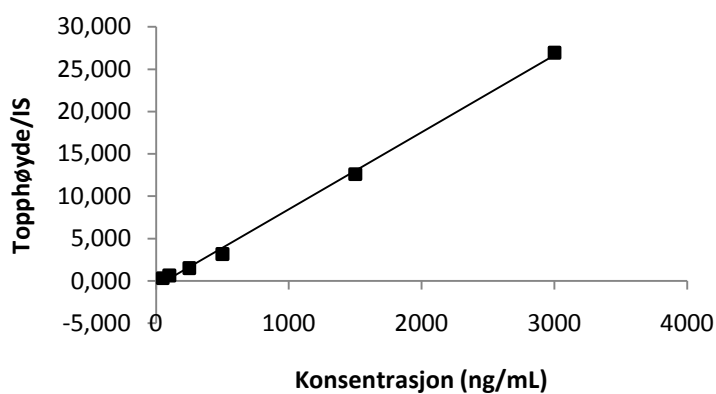
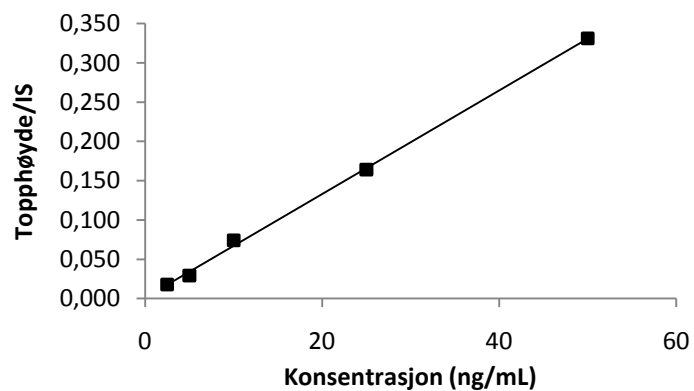
Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
CsA	2,5-50 ng/mL	$y = 0,007x - 0,0017$	0,9986
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0085x - 0,539$	0,9982
AM19	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0176x - 0,0043$	0,9986
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0215x - 1,3662$	0,9982
AM1c9	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0117x - 0,0028$	0,9986
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0142x - 0,9055$	0,9982
AM1	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0082x - 0,0102$	0,9947
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0072x + 0,1892$	0,9988
AM9	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0149x - 0,0141$	0,9974
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0148x - 0,1571$	0,9985
AM1c	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0027x - 0,0019$	0,9964
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0026x + 0,0365$	0,9995
AM4N	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0153x - 0,0037$	0,9986
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0186x - 1,1841$	0,9982

Figur 0.4 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). R<sup>2</sup> = regresjonskoeffisient.

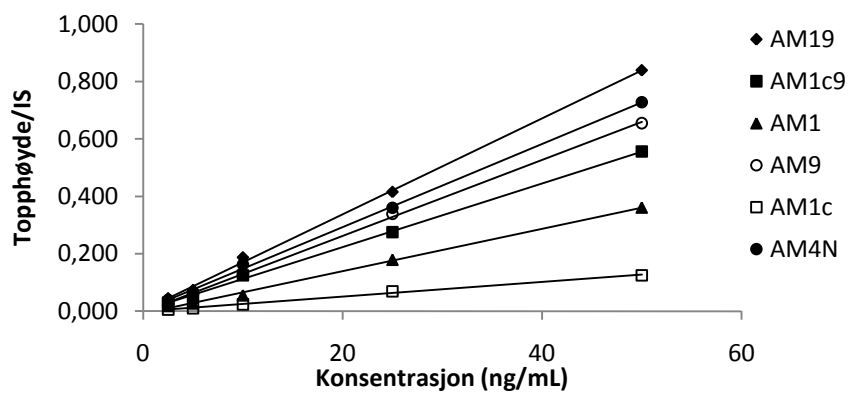
## Gruppe 5

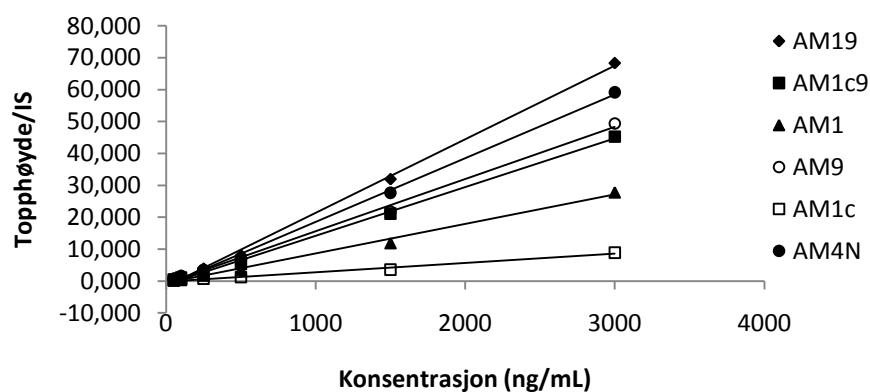
Standardkurvene gjelder for pasient 26 ved blodprøver tatt i perioden 41-86 dager etter hjertetransplantasjon, for pasient 27 ved samtlige blodprøver og for pasient 2 i perioden 8-22 dager etter hjertetransplantasjon.

a)



b)





c)

Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
<b>CsA</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0066x + 0,0013$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0091x - 0,6522$	0,9978
<b>AM19</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0167x + 0,0032$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0231x - 1,6529$	0,9978
<b>AM1c9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0111x + 0,0022$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0153x - 1,0956$	0,9978
<b>AM1</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0074x - 0,0081$	0,9979
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0093x - 0,6321$	0,9947
<b>AM9</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0132x - 0,0024$	0,9995
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0164x - 0,783$	0,9963
<b>AM1c</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0026x - 0,0006$	0,996
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0029x - 0,1513$	0,9903
<b>AM4N</b>	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0145x + 0,0028$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,02x - 1,4326$	0,9978

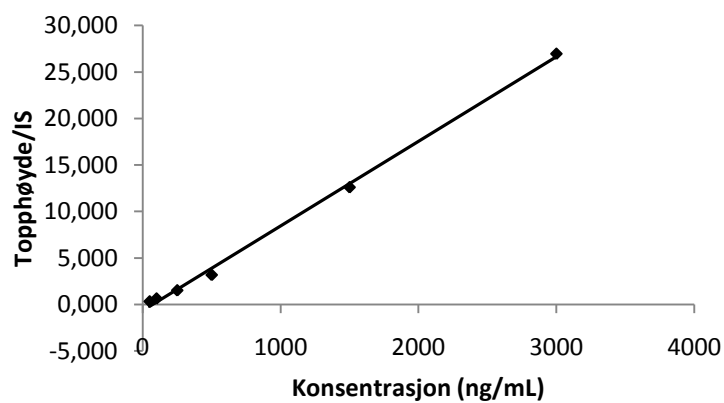
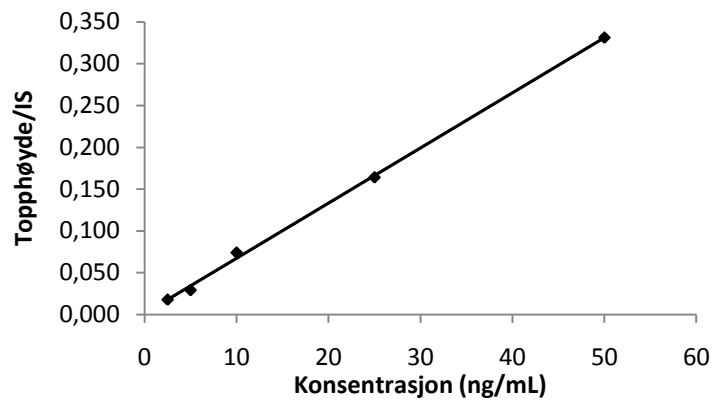
Figur 0.5 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). R<sup>2</sup>= regresjonskoeffisient.

---

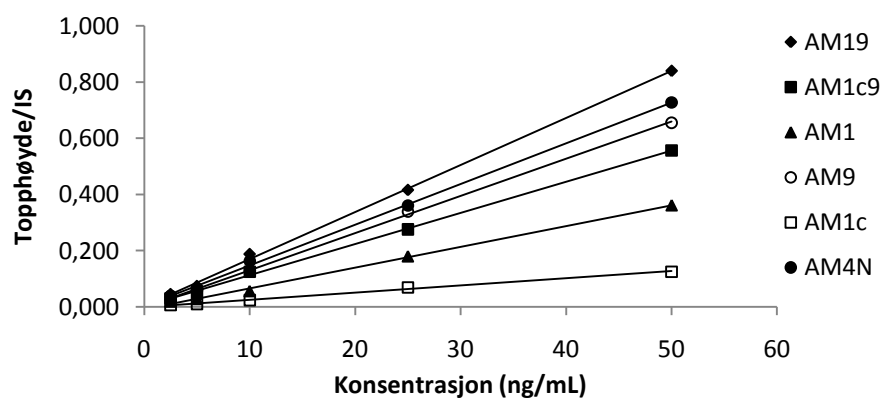
## Gruppe 6

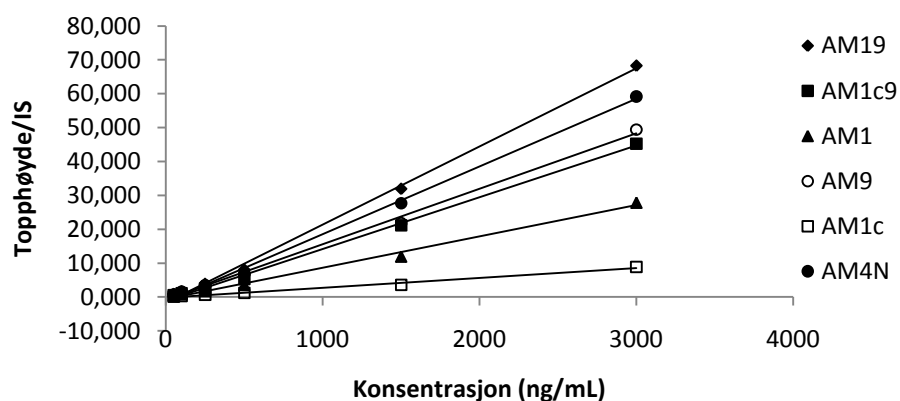
Standardkurvene gjelder for pasient 28 ved blodprøver tatt i perioden 24-74 dager etter hjertettransplantasjon, og for samtlige dager for pasient 29 og 30.

a)



b)





c)

Analytt	Fullblod		
	Konsentrasjonsintervall	Formel for lineærregresjon	R <sup>2</sup> -verdi
CsA	2,5-50 ng/mL	$y = 0,0066x + 0,0013$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0091x - 0,6522$	0,9978
AM19	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0167x + 0,0032$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0231x - 1,6529$	0,9978
AM1c9	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0111x + 0,0022$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0153x - 1,0956$	0,9978
AM1	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0074x - 0,0081$	0,9979
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0093x - 0,6321$	0,9947
AM9	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0132x - 0,0024$	0,9995
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0164x - 0,783$	0,9963
AM1c	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0026x - 0,0006$	0,996
	50-3000 ng/mL	$y = 0,0029x - 0,1513$	0,9903
AM4N	2,5-3000 ng/mL	$y = 0,0145x + 0,0028$	0,9989
	50-3000 ng/mL	$y = 0,02x - 1,4326$	0,9978

Figur 0.6 Standardkurve for a) CsA i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL og b) metabolittene i fullblod i konsentrasjonsintervallene 2,5-50 ng/mL og 50-3000 ng/mL. Formel for lineærregresjon og R<sup>2</sup>-verdi for CsA og metabolittene i begge konsentrasjonsintervallene er vist i c). R<sup>2</sup> = regresjonskoeffisient.

## Intracellulær- og fullblodskonsentrasjoner

Fullstendige intracellulær- og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene AM19, AM1c9, AM1, AM9, AM1c og AM4N, med Post HTx-dager og CsA-doser. AM19, AM1c9 og AM4N er funnet ved hjelp av ekstrapolerte standardkurver.

### Pasient 21

*Tabell 0.3 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 21 ved de 15 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon.*

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
16	350	11,06	49,79	17,11	651,61	56,64	63,78	6,00	299,74
18	350	24,40	107,70	20,68	682,67	72,50	88,31	7,03	309,15
20	350	18,99	107,33	20,74	634,58	66,76	71,14	6,14	301,27
23	350	14,07	36,82	14,81	556,93	35,62	61,55	5,03	262,33
26	350	7,55	50,78	25,88	756,43	56,52	102,56	7,27	357,25
27	350	39,31*	115,75	19,20	795,03	68,76	92,26	5,69	355,78
30	350	9,53	136,64	26,85	950,39	88,64	91,46	6,67	396,14
33	325	9,33	123,22	22,22	973,24	124,20	98,75	7,98	378,86
36	325	11,70	40,48	13,79	807,95	82,77	68,99	5,81	339,75
38	325	12,36	42,01	15,65	718,62	84,69	94,66	6,58	356,58
44	300	9,36	40,82	15,47	1021,15	62,87	76,68	7,34	564,36
52	275	4,11	25,13	9,15	523,14	52,02	36,67	4,33	251,51
59	250	6,29	89,46	8,80	601,56	38,27	27,85	-0,22	215,95
73	250	4,47	78,58	4,40	387,37	36,12	22,93	-0,09	191,71
87	250	5,84	94,88	11,78	576,09	73,01	25,63	0,31	199,79

## Pasient 22

Tabell 0.4 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 22 ved de 13 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
18	300	8,44	121,20	17,21	463,52	67,22	20,15	0,07	240,83
25	300	19,00	124,86	12,17	498,49	131,29	14,57	1,07	333,96
27	300	13,96	113,10	9,96	415,75	85,85	16,85	3,10	248,36
32	325	36,68*	185,12	31,15	515,33	134,40	35,46	5,23	250,10
39	325	19,97	122,18	12,50	448,84	149,05	18,17	1,79	327,67
42	325	8,15	125,83	13,73	324,31	78,32	18,24	2,16	261,64
46	300	6,82	85,70	2,50	251,10	26,27	7,71	0,69	176,49
48	350	4,77	73,12	1,81	196,08	40,45	11,08	0,91	174,40
52	325	6,00	86,68	4,55	222,75	31,76	11,21	2,60	228,79
55	325	1,57	94,50	6,72	290,19	70,27	12,91	-0,17	183,73
66	300	3,85	51,40	2,29	171,28	39,13	8,10	0,16	190,75
69	300	3,28	48,20	-3,40	181,33	48,46	6,29	-1,07	152,32
83	300	20,21	97,25	16,34	517,85	448,59	37,33	36,54	846,69

## Pasient 23

Tabell 0.5 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 23 ved de 12 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
25	475	7,30	76,12	5,62	533,74	94,39	46,09	3,62	228,34
32	450	2,21	72,14	2,02	500,92	49,67	30,73	0,74	250,85
36	450	4,90	118,36	15,21	801,72	130,98	44,89	4,08	312,52
39	475	6,17	71,88	6,14	445,61	60,90	33,75	0,53	281,76
43	450	9,76	100,37	10,67	502,71	107,33	41,43	6,40	317,10
46	450	6,36	85,45	6,50	453,61	56,23	30,47	1,74	236,26
50	450	5,04	109,03	14,82	736,06	123,12	39,00	7,12	354,12
53	425	2,47	82,60	11,05	565,38	90,43	39,71	3,22	269,34
57	425	2,04	117,89	5,67	345,23	118,37	101,50	5,24	353,84
60	425	11,01	111,93	8,36	535,18	141,12	101,37	3,51	305,87
72	425	-	121,55	9,39	545,30	155,44	94,93	4,50	309,48
88	400	9,23	108,59	8,20	547,97	156,58	41,81	5,64	293,83



## Pasient 24

*Tabell 0.6 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 24 ved de 21 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon.*

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
14	350	25,15	220,93	42,73	645,98	211,83	161,77	6,37	262,36
16	350	31,01*	286,32	47,02	747,65	241,93	164,83	8,47	348,42
21	350	13,68	214,51	24,95	507,41	164,93	98,46	4,97	281,86
23	350	21,89	361,14	44,41	1106,41	351,09	113,44	10,57	494,05
25	325	15,18	232,64	31,24	675,55	211,31	149,85	8,46	336,42
28	325	11,55	208,36	30,76	733,01	232,09	122,24	5,87	316,49
30	325	16,63	264,75	44,24	944,79	272,85	159,39	8,53	408,58
32	300	9,33	276,15	108,81	1168,20	348,22	198,21	9,77	449,46
35	300	8,54	207,01	27,75	736,10	239,39	142,84	4,76	285,27
37	300	5,25	207,89	31,02	1005,34	331,29	167,34	5,48	378,45
39	275	2,27	224,16	31,36	1150,56	279,80	184,69	5,38	362,43
42	275	3,53	162,47	17,75	682,29	231,95	133,21	3,33	265,10
44	250	12,34	213,02	26,75	924,30	301,87	166,76	5,95	360,91
46	250	16,08	177,28	19,05	906,26	232,57	140,05	4,07	296,92
49	250	5,91	212,49	33,49	949,60	265,00	180,49	3,80	298,54
52	250	10,56	180,97	22,12	844,71	262,20	146,16	4,29	314,00
56	250	8,46	167,83	16,45	751,80	213,07	119,85	3,39	309,79
59	225	8,79	164,88	21,88	842,93	250,96	143,24	4,62	356,41
63	200	9,13	128,38	8,05	663,19	184,70	112,23	2,14	317,46
70	200	9,73	119,39	8,60	619,56	186,12	104,64	2,01	275,01
84	200	15,91	143,92	12,21	1092,20	269,82	50,00	4,03	418,80

## Pasient 25

*Tabell 0.7 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 25 ved de 18 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.*

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
14	450	7,05	207,41	23,32	810,92	191,61	64,45	8,96	376,47
16	450	7,49	168,74	10,97	718,36	194,80	46,32	9,07	380,83
21	425	2,24	156,85	8,34	805,57	207,67	42,76	9,15	434,86
23	400	4,77	144,26	9,82	761,48	171,71	42,89	8,95	436,62
26	375	4,16	151,70	7,67	848,47	194,98	47,22	7,79	430,91
28	375	5,20	131,03	12,32	682,12	156,58	27,05	5,80	352,20
30	375	5,21	125,85	6,13	679,82	169,29	20,50	6,54	359,84
31	375	3,40	116,15	7,22	697,69	170,00	27,19	6,53	428,63
35	375	3,01	118,14	9,22	530,77	143,80	25,96	5,22	312,35
38	375	-	133,34	7,71	672,31	162,38	38,36	7,22	288,42
42	350	3,17	45,42	3,22	461,14	120,61	22,36	3,79	153,43
49	350	1,49	34,67	4,76	487,92	96,23	15,75	4,50	211,15
55	325	3,53	169,30	26,47	1004,91	220,22	43,76	7,83	382,41
56	325	4,23	111,99	8,19	566,02	137,44	29,18	5,72	278,28
70	325	4,10	120,52	17,95	648,78	156,37	29,10	5,99	320,59
84	325	7,20	49,98	6,17	564,48	155,88	32,76	8,72	557,31
91	325	3,80	106,22	6,32	896,13	159,76	43,36	5,63	291,41
97	325	-	35,20	6,44	728,38	154,48	43,34	5,75	376,01

## Pasient 26

Tabell 0.8 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 26 ved de 13 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
24	350	6,67	201,56	15,14	761,92	204,30	49,13	9,89	299,31
27	350	4,39	218,53	14,84	404,83	138,21	26,01	9,37	421,14
31	350	6,83	193,12	15,37	694,12	179,82	41,15	8,53	364,55
34	375	7,01	307,69	36,80	923,94	321,02	56,88	13,63	315,86
38	325	6,01	262,31	23,15	1082,11	300,16	56,52	12,80	513,30
41	325	3,01	150,02	7,43	720,71	182,35	37,69	6,71	325,32
43	325	2,37	168,62	10,59	848,38	153,62	37,32	4,96	319,50
45	300	1,34	146,71	7,32	560,72	147,05	26,95	4,04	267,92
48	300	2,45	128,90	7,73	561,29	132,17	38,02	4,64	243,85
51	300	2,99	143,79	8,34	571,59	140,03	42,22	5,44	214,60
58	325	5,19	148,06	7,80	771,12	159,02	110,07	5,64	233,33
73	325	-	141,36	10,94	626,79	156,06	107,05	5,98	250,57
86	325 ?	4,68	144,10	8,98	858,08	158,43	103,97	4,89	247,87

## Pasient 27

Tabell 0.9 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 27 ved de 11 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
27	150	3,83	211,69	25,85	860,04	165,23	124,31	10,39	292,86
33	150	2,68	155,54	21,53	735,31	148,32	120,03	14,46	264,17
41	125	-	130,80	9,38	529,39	152,48	107,88	7,75	205,84
43	150	2,92	155,70	13,09	677,14	170,62	119,69	14,65	282,70
48	150	2,59	163,79	14,25	678,69	152,02	120,70	6,79	183,35
55	150	-	137,15	14,03	654,25	148,22	118,23	4,80	221,06
61	150	8,29	148,53	12,00	831,00	132,91	126,73	5,36	211,18
63	150	-	153,52	17,04	764,14	134,03	138,08	4,82	217,95
69	150	3,15	199,83	17,46	813,09	148,92	150,35	4,94	220,89
72	175	4,20	197,43	22,77	1008,45	168,48	149,13	6,33	217,16
84	150	2,41	165,85	15,47	860,97	125,59	141,17	3,84	214,86

## Pasient 28

Tabell 0.10 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 28 ved de 12 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
8	150	4,32	128,73	14,07	953,83	149,98	161,58	5,14	340,72
11	175	17,48	163,37	19,28	1113,50	192,48	190,24	8,32	337,86
15	175	8,18	141,35	17,23	1141,58	174,54	181,26	5,99	400,56
18	150	13,13	46,26	10,22	777,04	131,42	127,89	4,11	315,75
22	150	8,58	159,63	14,67	1372,48	223,53	252,58	10,85	448,66
24	175	9,38	128,73	10,90	866,05	142,01	147,95	5,51	284,55
28	175	10,60	122,08	8,54	769,08	158,12	152,49	7,91	380,24
31	175	11,03	113,39	6,74	628,94	125,60	122,68	4,06	288,26
35	175	17,26	45,18	5,58	649,28	119,08	120,01	5,32	303,51
45	175	12,10	26,90	3,17	508,52	108,80	44,79	2,68	232,68
57	175	7,08	26,35	2,47	480,98	114,80	41,71	2,41	282,63
74	175	5,10	16,91	1,43	356,70	102,12	27,39	2,21	187,24

## Pasient 29

Tabell 0.11 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 29 ved de 16 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
13	Uleselig	25,39*	199,91	23,58	759,91	206,09	124,33	7,55	266,69
17	450	13,60	179,46	17,78	647,53	168,25	102,60	4,34	251,54
20	450	15,86	193,79	19,30	442,78	137,75	95,51	5,19	207,99
24	425	10,63	207,28	19,94	620,13	182,63	99,09	6,50	332,71
26	425	13,01	199,57	13,65	882,95	202,65	105,88	5,31	285,76
31	400	21,49	157,72	11,37	753,82	175,42	98,81	4,39	247,36
33	400	18,03	183,07	17,93	957,46	198,82	112,16	6,05	341,06
37	400	34,22*	168,13	4,67	796,79	182,66	44,69	3,68	312,11
40	400	18,11	133,58	10,95	675,56	179,70	108,87	4,53	263,80
45	400	-	160,60	10,53	579,12	149,34	102,00	3,17	281,11
48	425	48,61*	185,38	10,15	583,94	217,14	99,39	5,18	229,69
51	425	18,36	144,16	7,36	534,43	137,48	29,41	3,72	264,83
52	425	17,64	125,94	3,95	441,00	123,38	22,29	3,03	249,10
59	425	126,97*	126,36	5,57	647,51	201,23	48,79	11,87	940,67
62	425	-	16,21	1,38	295,06	26,83	9,30	0,82	171,32
89	?	0,47	0,01	-0,19	2,56	0,43	0,61	0,15	1,22

## Pasient 30

Tabell 0.12 CsA-dose, intracellulærkonsentrasjoner av CsA og fullblodskonsentrasjoner av CsA og metabolittene til pasient 30 ved de 12 visittene inkludert i studien. post HTx-dager = dager etter hjertetransplantasjon, \* = ekstrapolert intracellulær konsentrasjon, - = manglende prøve.

post HTx - dager	Dose CsA (mg/dag)	Intracellulært	Fullblod						
		CsA (ng/mL)	AM19 (ng/mL)	AM1c9 (ng/mL)	AM1 (ng/mL)	AM9 (ng/mL)	AM1c (ng/mL)	AM4N (ng/mL)	CsA (ng/mL)
14	275	90,95*	215,19	14,00	778,51	168,31	136,32	10,04	491,91
17	225	-	177,22	11,66	1142,45	198,89	145,63	9,10	482,30
22	200	53,29*	158,01	6,54	633,63	121,67	43,26	7,06	337,80
24	200	57,03*	123,45	6,99	478,22	129,45	40,01	7,15	388,82
28	200	8,28	139,34	6,69	781,59	154,74	99,69	6,79	310,10
31	200	9,32	115,61	4,08	546,22	123,20	97,10	6,13	314,92
36	200	5,86	124,74	4,66	612,18	133,23	41,06	3,61	294,03
38	225	6,63	132,21	7,73	735,63	168,11	124,25	8,82	363,63
43	225	2,94	130,35	6,77	741,79	180,31	97,86	6,48	343,59
57	200	6,06	215,25	17,23	1859,78	380,48	146,35	18,34	784,12
72	200	-	128,62	4,91	553,29	162,57	35,36	5,97	302,62
86	200	4,16	117,10	5,38	455,54	111,95	30,29	4,50	257,27

---

## Studieprotokoll

### **Intracellular and renal/myocardial tissue concentrations of CsA and rejection frequency following renal transplantation.**

#### **Responsible investigator:**

Karsten Midtvedt, MD, Ph.D, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet.

#### **Co-investigators:**

Pål Falck Sprauten, Research fellow, M.Sc.(Pharm), Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Oslo.

Heidi Guldseth, Master grade student (Pharm), Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Oslo.

Lars Gullestad, MD, Ph.D., Department of Heart Medicine, Rikshospitalet.

Stein Bergan, Ph.D., Department of Clinical Chemistry, Rikshospitalet.

Nils Tore Vethe, Research fellow, M.Sc.(Pharm), Department of Clinical Chemistry, Rikshospitalet.

Per Pfeffer, MD, Ph.D., Surgical Department, Rikshospitalet.

Professor Svein Simonsen, MD, Ph.D., Department of Heart Medicine, Rikshospitalet.

Arne K. Andreassen, Department of Heart Medicine, Rikshospitalet.

Professor Odd R. Geiran, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Rikshospitalet.

Professor Anders Hartmann, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet.

---

Anders Åsberg, Associate Professor, Ph.D., Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Oslo.



---

## Background

Immunosuppressive therapy with cyclosporine A (CsA) is an essential back-bone in the immunosuppressive therapy of solid organ transplant recipients. A major drawback of CsA is however that it is associated with side-effects such as hypertension, dyslipidemia and intermittent renal hypoperfusion/graft dysfunction. It has not been clearly established if it is the peak concentration ( $C_{\max}$ ) of CsA or the area under the blood concentration versus time curve (AUC) for CsA that best predicts relevant immunosuppressive effect [1]. Monitoring CsA therapy using  $C_2$  levels of whole-blood CsA concentrations has been shown to give superior clinical outcome (reduced acute rejection rates) as compared to trough concentration ( $C_{\min}$ ) monitoring [2]. However, considering the potential side-effects,  $C_{\min}$  concentrations may also be of relevance.

The immunosuppressive effect of CsA is mediated mainly through inhibition of NF-AT induced gene transcription, which results in inhibited proliferation of activated T-lymphocytes. Intracellular CsA-cyclophilin complex inhibits calcineurin phosphatase activity and hence inhibits the translocation of NF-ATs which unable it to induce transcription of several genes, especially IL-2 transcription.

In a recent study, therapeutic concentrations of CsA, but not tacrolimus, has been shown to up regulate P-glycoprotein (P-gp) in endothelial and renal tubule cells *in vitro* in rat [3]. Since CsA is a substrate for P-gp this may affect CsA pharmacokinetics [4]. Lymphocytes also express P-gp in their cell membrane [5] and it has also been described that P-gp in these cells are up regulated during acute rejection episodes [6]. Such up-regulation would lead to lower intracellular concentrations of CsA, and this may be a potential mechanism for the acute rejection episode *per se*.

Further more, recently published studies also indicate that CYP3A5 genotype may interfere with CsA pharmacokinetics [7]. Genotyping of both CYP3A5 and P-gp may therefore add important knowledge on CsA pharmacokinetics in this setting. The main enzyme responsible for metabolism of CsA, CYP3A4, does not exist in different genotypes but show a large degree of phenotypic variation. Individual activities of CYP3A4 may be estimated using different probe drugs metabolised by the same enzyme and determine the metabolite to parent-drug concentrations ratio. One such probe is quinine, which has been validated in the general population [8], but so far not in the transplant population. Such CYP3A4 phenotype

---

determination in transplanted patients may further give valuable information on the overall understanding of the pharmacokinetics of CsA.

Since CsA exerts its immunosuppressive effect within lymphocytes it would be more relevant to measure the local concentrations of CsA within these cells and one paper has been published on such a method [9]. Recent proteomic-based studies have shown different protein-pattern in urine from patients during an acute rejection episode as compared with non-rejecting patients and healthy controls [10, 11]. This might be a useful screening-tool in the future care of transplanted patients.

In addition, since CsA administration is associated with both nephrotoxic and cardiotoxic effects, which in part is likely to be due to a local effect in these organs, measuring renal and heart tissue concentrations of CsA would also give more information on the local organ toxic effects. One previous paper has described the procedure for renal tissue concentration measurements of CsA [12].

### **Study objectives**

The primary objective is to investigate intralymphocyte concentrations of CsA in renal and heart transplant recipients to elucidate the association between the intracellular concentration and efficacy (rejection episodes and histology) in transplanted patients on CsA based immunosuppressive therapy.

Secondary objectives are to investigate associations between; intralymphocyte concentrations and whole-blood concentrations of CsA, renal tissue concentrations and nephrotoxicity, heart tissue concentrations and cardiotoxicity with CsA based immunosuppressive therapy in transplanted patients. In addition, validate the use of quinine as a probe for determination of CYP3A4 activity in transplanted patients as well as proteomic-based urine analyses as a screening tool for acute rejection episodes in transplanted patients.

### **Study design**

Twenty kidney- and 10 heart transplanted patients will be included in the study. The study duration is 12 weeks. Eligible patients will be included during the 1<sup>st</sup> posttransplant week. Study specific blood samples for CsA analysis will be taken in association with standard

---

routine blood samples for clinical follow-up of transplanted patients, typically three times a week the first weeks, then twice weekly followed by weekly samples up to 12 weeks posttransplant. At these time-points morning spot urine will also be collected.

A selection of 10 patients (at least 3 heart transplants) are to be examined with full 12 hour pharmacokinetic profiles in the early posttransplant phase when CsA therapy is at steady-state and before any known rejection episodes. In association to this full pharmacokinetic investigation the selected patients will receive 250 mg quinine as a single dose eight hours following the administration of the morning dose of CsA. A 24 hour sample for analysis of quinine (16 hour sample) and CsA will in addition be taken.

All blood samples will be analysed for both whole-blood and intralymphocyte CsA concentrations. Study specific blood sample of 2 x 7 mL (heparin vacutainer tubes) is needed for whole-blood analysis of CsA and extraction of lymphocytes in order to be able to measure the intracellular concentrations of CsA and other analyses. Samples from the 12 hour kinetic investigation as well as the 24 hour sample (16 hour quinine) should in addition to CsA also be analyzed for quinine and its 3-hydroxyquinine metabolite.

In renal transplant recipients one additional renal core biopsy will be taken for intrarenal CsA concentration analysis when a biopsy is indicated due to suspicion of acute renal rejection and in heart transplant recipients one of the six heart biopsy that are taken routinely during follow-up at posttransplant week 1, 3, 5, 7, 10 and 12 will be allocated to CsA concentration analysis. Additionally may one of the six clinical heart biopsies taken on clinical acute rejection suspicion be allocated to CsA concentration analysis.

Organ function evaluation during the study procedure will be performed according to standard follow-up procedures of the patients.

### **Inclusion criteria**

1. Renal or heart transplant recipients scheduled to receive CsA as part of their immunosuppressive therapy at the time of transplantation.
2. 18 years of age or older.
3. Signed informed consent.

### **Exclusion criteria**

- 
1. Known contraindications for renal or heart biopsies, respectively, at the time of inclusion.
  2. Concomitant treatment with: diltiazem, verapamil, fenytoin, carbamazapin, fluconazole, ketoconazole, erythromycin, clarithromycin.

## **Patients**

The patients will follow standard posttransplant procedures at Rikshospitalet.

Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and GCP. Patients and investigator will sign the patient information which will be kept on file. The patient will receive a copy of the patient information. The patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

## **Study procedures**

### *Genotyping:*

Whole-blood (heparin) will be drawn once during the study for determination of *CYP3A5*\*3 and *MDR-1* (*G1199A*, *C1236T*, *G2677T*, *G2677A*, *G2677G* and *C3435T*) genotyping [13-15]. The genotype of the graft will also be assessed as far as possible.

### *Blood samples:*

Whole-blood samples (heparin vacutainer tubes) of 2 x 7 ml for determination of whole-blood CsA concentration and intralymphocyte concentrations of CsA will be taken at as many regular blood sampling time-point as possible in the patients, typically thrice weekly initially and weekly at the end of the study period. One aliquot of isolated lymphocytes will be stored at -80 °C for mRNA analysis of P-gp. In addition to standard Tx-analysis differential count of white blood cells are to be done at all time-points.

For the 12 hour PK profile, the patients meets fasting in the morning, and blood samples (2 x 7 ml heparin) will be taken before administration of CsA (0 hours) and: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 hours following administration. An additional sample (1 x 7 ml

---

heparin) will also be collected the morning after (24 hours after the first dose in the PK profile).

Blood samples (PAXgene Blood RNA tubes, PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) for mRNA isolation will be collected on two different occasions before any acute rejection episode and every time a study biopsy is taken in order to determine gene expression of P-gp and possible other interesting parameters at the time of analysis.

#### *Biopsies:*

One extra renal/heart biopsy dedicated to this study is to be taken each time the patients have to take a biopsy on clinical indication or in accordance to routine follow-up. The biopsy is wrapped in a piece of aluminium foil or placed in a cryotube and stored at -20 °C until analysis.

#### *Urine*

Morning spot urine samples, at least 20 ml, will be collected at each time-point a blood sample is collected (only once during the 12 hour PK profile), centrifuged at 1000g for 10 minutes and the supernatant stored at -70° until analysis.

#### *Clinical information:*

Information of clinical signs for acute rejection episodes, such as S-creatinine, for kidney and ekko and MR for heart transplant recipients, respectively, will be obtained and included in the CRFs from the routine follow-up samples.

#### *Food:*

During the 12 hour PK profile patients meet fasting from 24:00 the evening before. A standard hospital breakfast can be consumed 2 hours after CsA administration. Standard lunch and dinner can also be consumed.

#### *Laboratory methods:*

Lymphocyte isolation will be performed with commercial kits (PrepaCyte and VitaLyse, BioE Inc., MN, USA).

---

Whole-blood, lymphocyte and biopsy samples will be analyzed for CsA (and the main metabolites AM4N, AM1, AM9) with HPLC-MS-MS at the School of Pharmacy [9, 12, 16]. Quinine and 3-hydroxyquinine will be analyzed with HPLC at the Department of Clinical Chemistry, Rikshospitalet.

Analysis of P-gp mRNA will be performed using real-time RT-PCR methodology at the Department of Clinical Chemistry, Rikshospitalet.

Proteomic analyses in collected urine samples will be analysed with 2D HPLC-MS analysis at the School of Pharmacy (currently under development).

### **Pharmacokinetic calculations**

Nonlinear mixed effects modeling (NONMEM software and Intel Fortran (version 8) compilation tool) will be used to analyze the dose-concentration-time data for CsA using a population approach. The pharmacokinetic profile data will be used to develop a pharmacokinetics model including the effect of major covariates (e.g. age, gender, body size, renal function, acute rejection status etc.) on CL/F and V/F from the 12-hour pharmacokinetics investigations in a sub-set of patients. Patients included in this part of the investigation will be defined as 'evaluable' for pharmacokinetic analysis if they have at least eight usable samples during the 12-hour pharmacokinetic investigation. The model will be further developed, and used, by using trough concentration data on all patients in the study.

Exclusion of patient data will only be allowed if CsA concentrations have not been able to be measured accurately or in case of unavailable information that may interfere with pharmacokinetic evaluation, e.g. exact blood sampling time or dose given.

Standard descriptive non-compartmental calculations of the pharmacokinetics parameters;  $AUC_{0-12}$ ,  $C_{trough}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  and  $C_{12}$  will also be determined.

### **Statistical considerations**

#### *Sample size:*

In the present descriptive study numbers needed to be included is empirically based. We do not have any information on intracellular CsA concentrations and we believe that 30 patients in total (20 renal- and 10 heart transplant recipients) will give us enough information to

---

elucidate the study objectives. A post study calculation of the study power will be performed for descriptive purposes only.

*Analysis plan:*

Both NONMEM derived as well as non-compartmental determined pharmacokinetic parameters will be included in the analyses as appropriate.

The primary end-point will be analyzed per-protocol by regression analysis. Relevant histological markers as well as clinical signs of acute rejection will be analyzed versus the intralymphocytic concentration of CsA at the relevant time-points.

Secondary endpoints will be analyzed as follows:

- Regression analysis comparing intralymphocyte and whole-blood concentrations of CsA before an acute rejection episode.
- Descriptive listing of changes in the relationship between whole-blood and intralymphocyte concentrations during an acute rejection episode.
- Regression analysis comparing intra renal CsA concentrations and relevant clinical markers for renal toxicity, such as renal function and change in renal function in presence of signs of acute rejection.
- Regression analysis comparing intra heart CsA concentrations and relevant clinical markers for cardiomyocyte toxicity, such as ECG or MR.
- Regression analysis comparing intra renal concentrations of CsA metabolites and histological markers for CsA toxicity.
- Regression analysis comparing intra heart concentrations of CsA metabolites and histological markers for CsA toxicity.
- Regression analysis comparing intra renal concentrations of CsA metabolites and relevant clinical markers for renal toxicity, such as renal function and change in renal function in presence of signs of acute rejection.
- Regression analysis comparing intra heart concentrations of CsA metabolites and relevant clinical markers for cardiomyocyte toxicity, such as ECG or MR.
- Descriptive listing of CsA and metabolites concentrations in CYP3A5\*3/\*3 patients compared to the other patients. It is anticipated that an exploratory analysis will be performed to compare the two groups.

- 
- Descriptive listing of CsA and metabolites concentrations in patients with different combinations of MDR-1 genotypes compared to the other patients. It is anticipated that an exploratory analysis will be performed to compare the two groups.
  - Descriptive listing of histological markers for renal and heart toxicity in CYP3A5\*3/\*3 patients compared to the other patients as well as in patients with different MDR-1 genotypes. It is anticipated that an exploratory analysis will be performed to compare some of the groups.
  - Descriptive listing of P-gp mRNA expression in lymphocytes and whole-blood both before and during an acute rejection episode.
  - Regression analysis of relevant histological markers as well as clinical signs of acute rejection versus results from proteomic analyses in urine at the relevant time-points.

### **Study duration**

Each transplanted patient will be followed for 12 weeks.

First patient in: Q1 2005.

Anticipated recruitment time: 12 months.

### **Insurance**

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.



---

## References

1. Tarantino A, Passerini P, Campise M, Bonizzoni E, Ceccarini F, Montagnino G, Aroldi A, Ponticelli C. Is cyclosporine in renal-transplant recipients more effective when given twice a day than in a single daily dose? *Transplantation* 2004; 78:675-680.
2. Thervet E, Pfeffer P, Scolari MP, Toselli L, Pallardo LM, Chadban S, Pilmore H, Connolly J, Buchler M, Schena FP, Carreno CA, Dandavino R, Cole E. Clinical outcomes during the first three months posttransplant in renal allograft recipients managed by C2 monitoring of cyclosporine microemulsion. *Transplantation* 2003; 76:903-908.
3. Hauser IA, Koziolk M, Hopfer U, Thevenod F. Therapeutic concentrations of cyclosporine A, but not FK506, increase P- glycoprotein expression in endothelial and renal tubule cells. *Kidney Int* 1998; 54:1139-1149.
4. Bonhomme-Faivre L, Devocelle A, Saliba F, Chatled S, Maccario J, Farinotti R, Picard V. MDR-1 C3435T polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78:21-25.
5. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1992; 80:2735-2739.
6. Zanker B, Barth C, Menges AV, Lammerding P, Stachowski J, Baldamus CA. Expression of the multidrug resistance gene MDR-1 in peripheral blood mononuclear cells from cyclosporine-treated renal transplant recipients rejecting their graft. *Transplant Proc* 1995; 27:925-926.
7. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14:147-154.
8. Wanwimolruk S, Paine MF, Pusek SN, Watkins PB. Is quinine a suitable probe to assess the hepatic drug-metabolizing enzyme CYP3A4? *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54:643-651.
9. Masri MA, Barbari A, Stephan A, Rizk S, Kilany H, Kamel G. Measurement of lymphocyte cyclosporine levels in transplant patients. *Transplant Proc* 1998; 30:3561-3562.
10. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J, Nickerson P. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:219-227.
11. Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* 2003; 237:660-664.
12. Whitman DA, Abbott V, Fregien K, Bowers LD. Recent advances in high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: detection of cyclosporine and metabolites in kidney and liver tissue. *Ther Drug Monit* 1993; 15:552-556.

- 
13. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:1137-1143.
  14. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002; 48:1668-1671.
  15. Katz DA, Grimm DR, Cassar SC, Gentile MC, Ye X, Rieser MJ, Gordon EF, Polzin JE, Gustavson LE, Driscoll RM, O'Dea R F, Williams LA, Bukofzer S. CYP3A5 genotype has a dose-dependent effect on ABT-773 plasma levels. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:516-528.
  16. Hermann M, Christensen H, Reubsaet JL. Evaluation of essential parameters in the chromatographic determination of cyclosporin A and metabolites using a D-optimal design. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30:1263-1276.

# Tilrådning fra Regional komité for medisinsk forskningsetikk



## UNIVERSITETET I OSLO DET MEDISINSKE FAKULTET

Overlege dr.med. Karsten Midtvedt  
Medisinsk avdeling  
Rikshospitalet

Regional komité for medisinsk forskningsetikk  
**Sør- Norge (REK Sør)**  
Postboks 1130 Blindern  
NO-0318 Oslo

**Dato:** 11.04.2005  
**Deres ref.:**  
**Vår ref.:** S-05044

Telefon: 228 44 666  
Telefaks: 228 44 661  
E-post: [rek-2@medisin.uio.no](mailto:rek-2@medisin.uio.no)  
Nettadresse: [www.etikkom.no](http://www.etikkom.no)

**S-05044 Intracellulær- og vevskonsentrasjon av ciklosporin hos nyre- og hjerte-transplanterte pasienter**

Prosjektleder: Overlege dr.med- Karsten Midtvedt, Medisinsk avdeling, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF (Stipendiat: Pål Falck Sprauten)

Vi takker for brev datert 28.02.05 med vedlegg: revidert pasientinformasjon og samtykkeerklæring.

Komiteen har ingen merknader til revidert pasientinformasjon og samtykkeerklæring.

Komiteen tilrår at prosjektet gjennomføres og at forskningsbiobank opprettes.

Vi ønsker lykke til med prosjektet!

På grunn av stor saksmengde har vi dessverre ikke kunnet svare så raskt som vi ønsker.

Med vennlig hilsen

Sigurd Nitter-Hauge (sign)  
Professor dr.med.  
Leder

Tone Haug  
Rådgiver  
Sekretær

Kopi: Sosial-og helsedirektoratet, Postboks 7000, St. Olavs plass, 0130 Oslo

---

## Pasientinformasjon



**Rikshospitalet**  
Universitetsklinikk



**UNIVERSITETET  
I OSLO**

### **Forespørsel om å delta i forskningsprosjektet:**

#### ***Intracellulær- og vevskonsentrasjon av ciklosporin hos hjertetransplanterte pasienter***

Dette er en forespørsel til deg som nylig har gjennomgått hjertetransplantasjon og som bruker Sandimmun Neoral<sup>®</sup> (virkestoff: ciklosporin) som en del av den immundempende behandlingen (dvs. medikamenter for å forhindre avstøtning av det nye organet) om å delta i en klinisk studie. I denne studien skal man undersøke konsentrasjonen av ciklosporin både inne i hvite blodceller og i hjertet. Studien er en nasjonal studie som leger ved Rikshospitalet har tatt initiativ til, i samarbeid med forskere ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

#### **Formål med studien:**

Etter transplantasjonen trenger du legemidler som demper immunforsvaret ditt for at det nye organet ikke skal avstøtes. Behandling med Sandimmun Neoral<sup>®</sup> er standard behandling ved Rikshospitalet, men det er fremdeles flere aspekter med behandlingens effekt og bivirkninger som ikke er fullstendig kartlagt. Formålet med studien er å få en bedre forståelse av både effekt og bivirkninger som er knyttet til behandlingen med Sandimmun Neoral<sup>®</sup>. Vi vil derfor måle konsentrasjonen av virkestoffet lokalt der det virker, nemlig inne i de hvite blodcellene og inne i hjertet. Alle prøvene i studien vil bli tatt samtidig med standard blodprøver som allikevel tas som del av din oppfølging på Rikshospitalet.

Variasjoner i enkelte gener hos mennesker gjør at vi bryter ned legemidler forskjellig. Ved å undersøke genene dine kan vi bli i stand til bedre å forstå hvordan dette innvirker på nedbrytningen av legemidlet, og dermed bedre individualisere behandlingen i fremtiden.

Vi ønsker også å måle ulike egghvitestoffer i urinen for å prøve å finne noen stoffer som kan hjelpe oss å diagnostisere akutte avstøtningsepisoder.

#### **Legemidlene:**

Alle legemidler som skal brukes i denne studien er standard behandling av hjertetransplanterte, og du ville få de uavhengig av om du deltar i studien eller ikke.

#### **Studieprosedyre:**

Som deltaker i denne studien vil du fortsatt bli fulgt opp av samme lege ved Rikshospitalet som ellers. Du trenger ikke komme på flere legebesøk enn vanlig, men da du allikevel tar blodprøver for oppfølging vil det bli tatt 2 ekstra rør med blod (ca 1 barneskje), men du vil ikke bli stukket noe ekstra, og du må levere en morgenurin også disse dagene. I tillegg vil vi ta en ekstra biopsi av hjertet i noen av de tilfellene hvor legen din likevel anser det som nødvendig å ta biopsi som del av din kliniske oppfølging, uavhengig av studien. Studien vil totalt vare i 3 måneder etter transplantasjon.

I prøvene vi samler fra deg vil vi analysere legemiddelkonsentrasjoner, egg hvitestoffer og hvilke gener du bærer på av noen egg hvitestoffer som er involverte i nedbrytningen av Sandimmun Neoral®. Disse analysene vil bli utført ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

#### **Fordeler og ulemper ved å delta i denne studien:**

Du vil sannsynligvis ikke ha noen direkte fordeler av å delta i studien, men du vil dog bidra til å øke kunnskapen om hvordan Sandimmun Neoral® brytes ned og fordeles i kroppen, og denne kunnskapen kan på lengre sikt føre til en bedre og mer individualisert behandling av transplanterte pasienter. Ulempen ved å delta vil være at det vil bli tatt noe ekstra blod ved de fleste standard blodtakningstidspunktene og du må levere en urinprøve i tillegg på disse dagene. En av biopsiene som allikevel skal tas for å vurdere din oppfølging etter transplantasjonen vil også bli brukt i studien.

#### **Frivillig deltakelse:**

Deltakelse i denne studien er frivillig. Du kan når som helst trekke ditt samtykke til å være med i studien uten å oppgi noen grunn til dette. Din videre oppfølging som transplantert vil ikke bli påvirket av din beslutning om å delta eller ikke å delta i denne studien. Prøvene tatt fra deg vil inngå i en såkalt biobank. Det vil i praksis si at de blir oppbevart i en fryseboks hos oss. Du kan når som helst forlange at prøvene dine blir destruert. Resultater som allerede er fremkommet vil imidlertid ikke slettes hvis de allerede inngår i et vitenskapelig arbeid.

#### **Innsyn i journal og personvern:**

All informasjon som innhentes om deg i forbindelse med denne studien vil bli behandlet konfidensielt. Statens Legemiddelverk eller andre kontrollmyndigheter vil imidlertid kunne ha behov for å sjekke at opplysninger gitt i studien stemmer overens med opplysninger i pasientjournalen din. Dette gjøres for å sikre studiens kvalitet.

Resultatene fra forsøket vil bli publisert i vitenskapelige tidsskrifter. Resultatene dine vil bli aidentifisert, slik at ingen bortsett fra forsøksleder kan spore de enkelte resultater tilbake til deg. I følge forskriften for kliniske studier vil dataene forbli aidentifisert inntil 15 år etter studieslutt, ca. 2021, før de blir slettet. Alt involvert personale som håndterer opplysninger om deg har taushetsplikt. Du kan når som helst kreve at de helse- og personopplysningene vi har samlet inn om deg blir utlevert til deg eller slettet. Hvis opplysningene imidlertid allerede inngår som en del av vitenskapelige arbeider er det begrenset hvilke opplysninger vi kan slette. Du vil etter hvert kunne få informasjon om studiens resultater ved henvendelse til hovedansvalig lege for denne studien, overlege Karsten Midtvedt ved Nyreseksjonen, Rikshospitalet.

#### **Forsikring:**

Du vil som deltaker i denne studien være dekket av en forsikring via Legemiddelansvarsforeningen. Studien har vært vurdert av Regional Komité for Medisinsk Forskningsetikk, Helseregion sør, Sosial- og helsedirektoratet, Personvernombudet for forskning ved Norsk Samfunnsvitenskapelig datatjeneste AS og av Statens Legemiddelverk.

Denne skriftlige informasjon skal ledsages av en muntlig informasjon. Har du spørsmål må du kontakte din behandlende lege. Du vil få en kopi av denne informasjonen og denne bør du spare på. Hovedansvalrige lege for denne studien er overlege Karsten Midtvedt, Nyreseksjonen, Medisinsk avdeling ved Rikshospitalet (23 07 18 94). Ansvarlig person for biobanken er amanuensis Anders Åsberg, Farmasøytisk institutt, universitetet i Oslo (22 85 65 59). Studien finansieres via driftsmidler ved Universitetet i Oslo.

Din lokalt ansvarlige lege er:

---

Undertegnede lege har gitt muntlig informasjon om studien og gitt pasienten tilbakemelding på eventuelle spørsmål:

---

Legens stempel og underskrift

---

Dato (må føres av legen)

## **SAMTYKKEERKLÆRING**

Undertegnede har lest og er blitt forklart innholdet i denne informasjonen og fått utlevert kopi av den.  
**Jeg er villig til å delta i studien.**

---

Pasientens underskrift

---

Dato (må føres av pasienten)

---

Pasientens navn med blokkbokstaver